



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

**COLONIZACIÓN MICORRÍCICA Y
RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL
CRECIMIENTO VEGETAL EN TRES ORQUÍDEAS
ENDÉMICAS DE MÉXICO**

CLAUDIA GARCÍA SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: **Colonización micorrícica y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tres orquídeas endémicas de México** realizada por la alumna: **Claudia García Sánchez**, baja la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

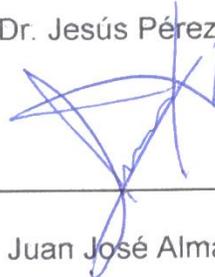
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



Dr. Jesús Pérez Moreno

ASESOR:



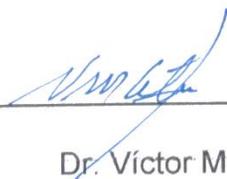
Dr. Juan José Almaraz Suárez

ASESOR:



Dr. Julián Delgadillo Martínez

ASESOR:



Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio 2021

COLONIZACIÓN MICORRÍCICA Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN TRES ORQUÍDEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO

Claudia García Sánchez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

En el ciclo de vida de las orquídeas participan hongos pertenecientes al grupo *Rhizoctonia*, Basidiomycota y Ascomycota, que se caracterizan por formar enrollamientos hifales en las células corticales de las raíces, y son imprescindibles en la germinación de las semillas. En las raíces, también se ha observado la presencia de rizobacterias, las cuales se han distinguido principalmente por sintetizar una fitohormona, el ácido indolacético (AIA). Por estas razones, en el presente trabajo se evaluó la presencia de los simbioses en el cortex de las raíces, asimismo se aislaron cepas bacterianas de las raíces en las orquídeas epífitas *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* y *Rhynchosstele aptera*, procedentes de tres comunidades: Santa Catarina Estetla, La Purísima Concepción y San Esteban Atatlahuca, en el estado de Oaxaca. En raíces seleccionadas se realizaron cortes transversales, se tiñeron y observaron al microscopio óptico, para registrar la intensidad y la extensión de la colonización en las raíces. Adicionalmente, se efectuaron aislamientos de cepas de bacterias a las cuales se les efectuaron dos pruebas: solubilización de fosfatos y producción de AIA. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza y una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). En *L. furfuracea*, se contabilizó una colonización promedio de 38 %, y la micorrización varió con respecto a la edad de las raíces (jóvenes, maduras y senescentes) y al área de las mismas (proximal, central y distal en relación a la base del pseudobulbo). En *P. karwinskii* la colonización fluctuó entre 65 y 68 %, sin encontrar diferencias significativas entre ambos sitios (Santa Catarina Estetla y La Purísima Concepción). Mientras que en *R. aptera* se reportó una colonización de 48 %. Con respecto a los aislamientos bacterianos, se obtuvieron 78 cepas de bacterias, de las cuales, 24 solubilizaban fosfatos, y 15 sintetizaron AIA. Las cepas bacterianas se pueden utilizar como una herramienta biotecnológica en la conservación de orquídeas, que son extraídas en grandes cantidades de su hábitat natural.

Palabras clave: Tejido cortical, pelotones, solubilización de fosfatos, síntesis de ácido indolacético.

MYCORRHIZAL COLONIZATION AND RHIZOBACTERIA OF THREE ENDEMIC ORCHIDS FROM SOUTHERN MEXICO

Claudia García Sánchez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

In the life cycle of orchids some fungi belonging to the *Rhizoctonia* group and other Basidiomycota establish mycorrhizal symbiosis, being characterized by forming hyphal coils in the cortical cells of the roots, and they are essential in the germination of seeds. The presence of rhizobacteria have also been observed, which have been distinguished mainly by the synthesis of the phytohormone, indoleacetic acid (IAA). However, particularly in epiphytic orchids, mycorrhizal colonization has been scarcely studied. In the present work, the intensity of mycorrhizal colonization was evaluated and colonies of plant growth promoting rhizobacteria were isolated from the roots of the epiphytic orchids *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* and *Rhynchosstele aptera*. These orchid species are native from Mexico and were sampled from three communities: Santa Catarina Estetla, La Purísima Concepción and San Esteban Atatlahuca, in the state of Oaxaca. One thousand six hundred and fifty root cross sections were made, stained and observed under an optical microscope, to record the intensity of colonization and the extent of colonization. Additionally, isolations of bacteria were carried out and tested for phosphate solubilization and IAA production. An Analysis of Variance and a Tukey test ($\alpha = 0.05$) were applied to the obtained data. In *L. furfuracea*, an average colonization of 38 % was recorded, and the mycorrhization was related to the roots ages (young, mature and senescent) and the root areas (proximal, central and distal in relation to the centre of the pseudobulbs). In *P. karwinskii* the colonization ranged between 65 and 68 %, without finding a significant difference between both sites (Santa Catarina Estetla and La Purísima Concepción). Meanwhile in *R. aptera* a mycorrhization of 48 % was reported. Regarding bacterial isolation, 78 colonies were obtained, of which 24 solubilized phosphates, and 15 synthesized IAA. The presence of fungal coils was frequently observed in the cortical tissue of all of the studied plants, and isolated plant growth-promoting bacteria were also characterized. This work demonstrates the potential of beneficial microorganisms to be used as a biotechnological tool in the growth and conservation of orchids, which are extracted in large quantities from natural habitats.

Keywords: Cortical tissue, coils, phosphate solubilization, indoleacetic acid production.

*Dedicado a
mi familia, en especial a mi mamá
Iraida
por su apoyo.*



AGRADECIMIENTOS



A Dr. Jesús Pérez Moreno,
Al Dr. Juan José Almaraz Suárez,
Al Dr. Julián Delgadillo Martínez,
Al Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá,
Al Dr. Alejandro Alarcón,
Al Dr. Gerardo Mata Montes de Oca,
A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas,
A la M. en C. Mónica Rangel Villafranco,

Por permitir el desarrollo de la investigación, por aclarar las dudas, por los conocimientos adquiridos y el apoyo brindado durante este tiempo, muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnologías (CONACyT), por la beca concedida para realizar los estudios en el Colegio de Postgraduados.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y al postgrado de Edafología por permitir el desarrollo de la investigación.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
ÁPENDICE.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	2
OBJETIVOS	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos.....	2
HIPÓTESIS.....	3
Hipótesis general	3
Hipótesis específicas	3
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Origen y distribución.....	3
Tipos y hábitos de crecimiento.....	4
Morfología.....	4
Relación entre las orquídeas epífitas y sus forófitos	5
Adaptaciones de las orquídeas epífitas	6
<i>Laelia furfuracea</i>	7
<i>Prosthechea karwinskii</i>	7
<i>Rhynchostele aptera</i>	8
Importancia biocultural de <i>Laelia</i> , <i>Prosthechea</i> y <i>Rhynchostele</i>	8
Conservación de las orquídeas en México	9
Simbiosis	9
Simbiosis orquideoide	9
Nutrición en las orquídeas.....	11
Evidencia del transporte bidireccional de nutrientes	11

Interacción rizobacterias-orquídeas	12
Literatura Citada.....	13
CAPÍTULO I. COLONIZACIÓN EN TRES ORQUÍDEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO.....	19
1.1 RESUMEN.....	19
1.2 ABSTRACT	20
1.3 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	21
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	22
1.4.1 Colecta del material vegetal	22
1.4.2 Clasificación de las raíces para su análisis	23
1.4.3 Tinción y colonización	24
1.4.4 Análisis estadístico	25
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
1.6 CONCLUSIONES	31
1.7 LITERARURA CITADA.....	31
CAPÍTULO II. BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS Y PRODUCTORAS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO ASOCIADAS CON ORQUÍDEAS EPÍFITAS.....	34
2.1 RESUMEN.....	34
2.2 ABSTRACT	35
2.3 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	36
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.4.1 Aislamiento de cepas bacterianas	37
2.4.2 Bacterias solubilizadoras de fosfatos.....	38
2.4.3 Bacterias productoras de ácido indolacético	39
2.4.4 Análisis estadístico	40
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
2.6 CONCLUSIONES	48
2.7 LITERATURA CITADA.....	49
CONCLUSIONES GENERALES.....	53
ANEXOS	54
APÉNDICE.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Colecta del material vegetal. A) bosque en la comunidad de Santa Catarina Estetla; B) colecta de *L. furfuracea*; C) bosque en la comunidad de La Purísima Concepción; D) colecta de *P. karwinskii*..... 23

Figura 1.2. Porcentaje de la colonización en el tejido cortical en las raíces de diferentes edades en *L. furfuracea*. Raíces jóvenes = barra negra; raíces maduras = barra gris; raíces senescentes = barra con diagonales. Los valores son medias + el error estándar, y aquellos con la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$); $n = 540$; Diferencia Mínima Significativa = 8.92..... 26

Figura 1.3. Porcentaje del tejido cortical colonizado en las diferentes áreas de las raíces: proximal, central y distal, en las raíces de diferentes edades de *L. furfuracea*. Raíces jóvenes = barra negra; raíces maduras = barra gris; raíces senescentes = barra con diagonales. Los valores son medias + el error estándar, y aquellos con la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$); $n = 180$; Diferencia Mínima Significativa = 17.35..... 27

Figura 1.4. Porcentaje de colonización en el tejido cortical de *P. karwinskii* y *R. aptera*. *P. karwinskii* colectada en la comunidad de Santa Catarina Estetla = barra negra; *P. karwinskii* de la comunidad La Purísima Concepción = barra con diagonales; *R. aptera* originaria de San Esteban Atlatlahuca = barra gris. Los valores son medias + el error estándar, y aquellos con la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$); $n = 675$; Diferencia Mínima Significativa = 16.11..... 28

Figura 1.5. Colonización en el tejido cortical de *L. furfuracea* y *R. aptera*. A) Cortex libre de micorrización a 10x; B) 100 % de colonización a 4x; C) Pelotones no digeridos a 40x; D) Pelotones digeridos e hifas fúngicas a 100x. A) y C) corresponden a *L. furfuracea*; B) y D) a *R. aptera*. 29

Figura 2.6. Diagrama de Venn que muestra las cepas de bacterias con la capacidad de solubilizar fosfatos (color rojo), bacterias que sintetizaron el ácido indolacético (color azul), y aislamientos que comparten ambas capacidades (color violeta) en las orquídeas epífitas evaluadas. 44

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en las orquídeas epífitas de estudio.	40
Cuadro 2.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos y productoras de ácido indolacético (AIA).....	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Curva patrón de fosfato dibásico de potasio ($K_2 HPO_4$).....	54
Anexo 2. Curva patrón de ácido indolacético (AIA)	54
Anexo 3. Características de las colonias de las cepas de bacterias aisladas.	55
Anexo 4. Crecimiento de las orquídeas en su habitat natural y colonización micorrícica en el tejido cortical de las raíces de las orquídeas. A) crecimiento de <i>L. furfuracea</i> ; B) crecimiento de <i>P. karwinskii</i> ; C) 100 % de colonización en el tejido cortical de <i>L. furfuracea</i> ; D) 50 % de colonización en el tejido cortical de <i>P. karwinskii</i> ; E) pelotones digestados en el cortex de <i>P. karwinskii</i> ; F) pelotones en diferentes estados de digestión en el cortex <i>L. furfuracea</i>	57

LISTA DE ÁPENDICE

Apéndice A.1. Medio de cultivo fuente combinada de carbono para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (Rennie, 1981).	58
Apéndice A.2. Medio de cultivo para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, modificado (Rennie, 1981).	59
Apéndice A.3. Medio para bacterias solubilizadoras de fosfato (Pikovskaya).....	59
Apéndice A.4. Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) modificado.	59

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las orquídeas están ampliamente distribuidas en el planeta y presentan una gran diversidad. Algunas de estas especies destacan por los variados usos que se les han dado desde tiempo prehispánicos, los cuales prevalecen hasta nuestros días. Por ejemplo, la vainilla es de importancia comercial, y otras especies poseen relevancia biocultural, y son empleadas en la medicina tradicional y en las festividades religiosas. En sí, la familia Orquidaceae resalta por las formas exóticas y la gama de colores que presentan sus flores (García-Peña y Peña, 1981; Solano-Gómez *et al.*, 2010).

Al ser especies de interés económico, las comunidades naturales de muchas de ellas se han visto disminuidas, debido a la cantidad de especímenes que son extraídos cada año. También, hay que considerar que su crecimiento y desarrollo es lento, y les toma años alcanzar su madurez y producir sus flores. Así como, la reducción de las poblaciones naturales de los polinizadores que establecen una relación específica con las orquídeas, lo que incrementa su vulnerabilidad, y el deterioro de su hábitat por el avance de la agricultura y la deforestación de los bosques (Menchaca, 2011; Fay *et al.*, 2015).

Su ecología es compleja, y a esto se suma, que requieren la participación de hongos orquideoides en la germinación de las semillas; los cuales les brindan los nutrientes necesarios para su desarrollo, hasta que se vuelven organismos fotosintéticos, aunque, muchas de ellas siguen dependiendo de esta simbiosis en su etapa adulta y han sido denominadas orquídeas “micoheterótrofas” (Rasmussen y Rasmussen, 2007; Smith y Read, 2008).

Adicionalmente, en sus raíces se ha descubierto la presencia de rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal, mediante la síntesis de fitohormonas, principalmente el ácido indolacético, o mediante la solubilización de fosfatos. La mayoría de los estudios con respecto a los simbioses se han desarrollado en especies terrestres de hábitat templado, mientras que las investigaciones en las áreas Neotropicales han sido insuficientes. De la misma manera, el estudio de las rizobacterias asociadas con las orquídeas, se ha efectuado en un número restringido de especies. En general, la mayor parte de los estudios se han centrado en las orquídeas terrestres y las investigaciones relacionadas con las orquídeas epífitas ha recibido poca atención (Tsavkelova *et al.*, 2006; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

México posee una diversidad importante de orquídeas, todas ellas escasamente estudiadas en relación a sus microsimbiontes. Tomando en consideración este escenario, en el presente trabajo se evaluó la colonización y la presencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en tres especies epífitas endémicas de México: *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* y *Rhynchostele aptera*, colectadas en tres comunidades de Oaxaca. Estas orquídeas son apreciadas por la belleza de sus flores, lo que las ha llevado a ser colectadas en grandes cantidades, y pone en riesgo su existencia.

OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVOS

Objetivo general

- ✚ Cuantificar la intensidad y la extensión de la colonización en el tejido cortical de las raíces y aislar a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal con la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar ácido indolacético asociadas a las raíces de *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* y *Rhynchostele aptera*.

Objetivos específicos

- ✚ Evaluar la colonización en el tejido cortical de las raíces de diferentes edades: jóvenes, maduras y senescentes en la orquídea epífita *L. furfuracea*.
- ✚ Valorar la colonización en el tejido cortical en tres zonas diferentes de las raíces: proximal, central y distal en relación a la base del pseudobulbo en *L. furfuracea*.
- ✚ Comparar el grado de colonización en las plantas de *P. karwinskii* colectas en dos zonas de estudio: En Santa Catarina Estetla y la Purísima Concepción, Oaxaca.
- ✚ Comparar el grado de colonización entre *P. karwinskii* colectada en los dos sitios de estudio y *R. aptera* originaria de San Esteban Atatlahuca, Oaxaca.
- ✚ Aislar bacterias a partir de las raíces de *L. furfuracea*, *P. karwinskii* y *R. aptera*.
- ✚ Realizar las evaluaciones cualitativas y cuantitativas en las cepas de bacterias para identificar aquellas con la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar ácido indolacético en las tres orquídeas epífitas en estudio.

HIPÓTESIS

Hipótesis general

- ✚ El tejido cortical de las raíces estará colonizado por los simbioses y se encontrará la presencia de rizobacterias con la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar ácido indolacético en las raíces de *L. furfuracea*, *P. karwinskii* y *R. aptera*.

Hipótesis específicas

- ✚ El tejido cortical de las raíces de *L. furfuracea*, *P. karwinskii* y *R. aptera* estarán colonizadas por los simbioses en diferentes grados.
- ✚ La colonización variará con respecto a la fenología de las raíces, y será más intensa en las raíces maduras, en comparación a las raíces senescentes y jóvenes en *L. furfuracea*.
- ✚ La colonización variará con respecto al área de la raíz y será más intensa en la región central de las raíces, en comparación al área proximal y distal en las raíces de *L. furfuracea*.
- ✚ El grado de colonización cortical en *P. karwinskii* colectada en las dos zonas de estudio: Santa Catarina Estela y San Esteban Atatlahuca, será similar.
- ✚ El tejido cortical de *P. karwinskii*, presentará la colonización más intensa y superará a *L. furfuracea* y *R. aptera*, debido a que sus raíces crecen por debajo de la corteza, y conservan mayor humedad, lo que beneficia el establecimiento los simbioses.
- ✚ Se aislarán bacterias promotoras del crecimiento vegetal con la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar ácido indolacético, en las raíces de *L. furfuracea*, *P. karwinskii* y *R. aptera*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen y distribución

Se estima que las orquídeas prosperaron en el Eoceno hace 54 millones de años (Honrubia, 2009), aunque, el primer registro fósil que se conoce es el polinario de *Meliorchis caribea*, el cual se descubrió en la abeja *Proplebeia dominicana* preservada en ámbar, la cual data del Cretácico Superior (76 a 84 millones de años) (Roberts y Dixon, 2008).

Las orquídeas se distribuyen en todos los continentes, con excepción de la Antártida (Fay y Chase, 2009) y en los desiertos, desde el nivel del mar hasta los 4 000 m de altitud (Téllez, 2011). Las especies epífitas se concentran en los trópicos húmedos, y las especies terrestres se agrupan en las zonas templadas (Fay y Chase, 2009). Cabe destacar que 69 % de la orquideoflora es de hábito epífita (Fay *et al.*, 2015).

Este grupo de monocotiledóneas pertenece a la familia más grande de angiospermas con más de 27 000 especies distribuidas en 899 géneros (The Plant List, 2013); cuya diversidad, representa alrededor de 10 % de las plantas con flores a nivel mundial (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2012). La familia Orchidaceae se subdivide en cinco subfamilias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cypripedioideae, Orchidoideae y Epidendroideae (Roberts y Dixon, 2008; Téllez, 2011).

En México se reconocen 1 260 especies de orquídeas distribuidas en 170 géneros, con un 40 % de endemismo (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2017). Aproximadamente 60 % se concentra en los bosques de neblina, tipo de vegetación que cubre solo 1 % del territorio nacional (Soto-Arenas *et al.*, 2007). Orchidaceae se encuentra entre las tres familias con mayor número de especies nativas, solo superada por Asteraceae y Fabaceae (Villaseñor, 2003).

Tipos y hábitos de crecimiento

Las orquídeas presentan dos tipos de crecimiento: 1) monopodial y 2) simpodial. Las primeras desarrollan un solo tallo o eje de crecimiento y no producen pseudobulbos, como *Phalaenopsis* y las segundas presentan varios ejes de crecimiento, por lo cual desarrollan varios tallos o pseudobulbos, tal es el caso de *Laelia* (Menchaca, 2011; Beutelspacher, 2012).

Por su hábito de crecimiento se clasifican en epífitas, terrestres, litófitas y trepadoras; entre las cuales se incluye el género *Vanilla*, e incluso hay una especie subterránea, la cual solo se localiza en Australia (*Rhizanthella gardneri*) (Roberts y Dixon, 2008).

Morfología

La morfología que exhiben estas especies está en función a su hábito de crecimiento. Las orquídeas epífitas cuentan con raíces aéreas que están cubiertas por una epidermis esponjosa conocida como velamen (Zotz y Winkler, 2013). Mientras que, las orquídeas terrestres, dependiendo de la especie, forman estructuras parecidas a los tubérculos subterráneos (Rittershausen y Rittershausen, 2014).

Las especies epífitas presentan un conjunto de tallos modificados o pseudobulbos (Beutelspacher, 2012), y las especies terrestres desarrollan un tallo único, en ambos casos los tallos terminan con el escapo floral (Rittershausen y Rittershausen, 2014).

En su mayoría, las epífitas poseen hojas gruesas de forma ovalada o lanceolada, de borde entero y venación paralela, mientras que las terrestres poseen hojas delgadas. En general, las hojas son perennifolias, pero algunas orquídeas terrestres presentan hojas caducifolias (Téllez, 2011; de la Rosa *et al.*, 2017).

Las flores son de simetría zygomorfa, con tres sépalos externos muy parecidos y tres pétalos centrales, de los cuales, uno posee una ornamentación diferente; el labelo, que puede producir néctar o compuestos aromáticos, cuya función es atraer a los polinizadores (Menchaca, 2011).

En la parte central del labelo se localiza la columna, una estructura floral donde se fusionan el pistilo y la antera, entre ambas estructuras se sitúa el róstelo, que evita la autopolinización, y en el ápice de la columna se encuentra el polinio (polen aglutinado) y el viscidio; una base cubierta de mucilago, que cumple con la función de adherir el polen a los polinizadores (Menchaca, 2011; Téllez, 2011).

El ovario se localiza al final de la columna, y una vez fecundado crece y se forma una cápsula dehiscente (Téllez, 2011) que puede contener de 1 000 a 4 000 000 de semillas, y el peso de cada una de las semillas oscila de 0.3 a 14 μg (Arditti, 1979).

Relación entre las orquídeas epífitas y sus forófitos

Las orquídeas epífitas han evolucionado para sobrevivir de manera preferente en la parte central de los árboles sobre los cuales crecen, es decir, en el segundo tercio de dichos árboles. Aquí encuentran las condiciones microclimáticas adecuadas para su establecimiento, en comparación con la parte inferior del hospedero donde llega una menor cantidad de luz o en la copa del mismo, donde la luminosidad es muy intensa lo cual dificulta la supervivencia de estas especies (de la Rosa-Manzano *et al.*, 2014).

La forma y la disposición de las ramas, es decir, la arquitectura del forófito juega un papel importante en el establecimiento de las orquídeas epífitas, así como la rugosidad de la corteza, ya

que está se asocia al éxito de colonización, puesto que permite un mejor anclaje de las raíces (Halbinger y Soto, 1997; de la Rosa-Manzano *et al.*, 2014).

Las orquídeas epífitas toman el agua y los nutrientes necesarios para su mantenimiento, a través del agua de lluvia, del rocío, de la neblina y de la humedad que se retiene en la materia orgánica, que se deposita en los troncos. El musgo y los líquenes también contribuyen a mantener el agua disponible (Rittershausen y Rittershausen, 2014; de la Rosa-Manzano *et al.*, 2017). Adicionalmente, su éxito también depende de la relación que entablan con los simbioses, la producción masiva de semillas y de los mecanismos especializados de polinización que han desarrollado.

Adaptaciones de las orquídeas epífitas

Las orquídeas epífitas son capaces de optimizar el uso de agua debido a diversas adaptaciones morfológicas y fisiológicas que han desarrollado a lo largo de su historia evolutiva. Las hojas están provistas de ceras que reflejan la luz y minimizan la pérdida de agua (de la Rosa-Manzano *et al.*, 2017). Los pseudobulbos, son una estructura especializada que permite el almacenamiento de agua y de los carbohidratos (Stancato *et al.*, 2001). Durante la época de sequía las orquídeas toman el agua almacenada en los pseudobulbos, para su mantenimiento, el cual se encoje hasta quedar deshidratado, este es un proceso natural, que sucede cada año en la mayoría de las especies epífitas, y sobre los pseudobulbos secos nacen los nuevos brotes (Stancato *et al.*, 2001; Rittershausen y Rittershausen, 2014).

La raíz aérea está cubierta por el velamen, cuya función es absorber el agua en segundos y, por lo tanto, los nutrientes contenidos en el agua de lluvia, además, evita la pérdida rápida de agua, protege a la raíz de la desecación, facilita el intercambio de gases, brinda protección mecánica a la raíz y permite el anclaje a los árboles (Rittershausen y Rittershausen, 2014; de la Rosa-Manzano *et al.*, 2017).

Las orquídeas de hábitat seco se caracterizan por presentar un velamen grueso, el cual contribuye a retener el agua por más tiempo, en comparación con las especies que poseen un velamen delgado. El color blanco del velamen refleja la radiación solar intensa y previene el sobrecalentamiento (Zotz y Winkler, 2013).

Otra adaptación importante es que la mayoría de las orquídeas epífitas capturan el CO₂ durante la noche, cuando la temperatura disminuye y la humedad relativa en el ambiente aumenta, y su metabolismo es del tipo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) (Stancato *et al.*, 2001; de la Rosa-Manzano *et al.*, 2017).

Laelia furfuracea

Dentro del género *Laelia* se han registrado alrededor de 25 especies neotropicales distribuidas de México a Bolivia, así como, en el sur de Brasil y en las Antillas. Su centro de diversidad se concentra en México, con trece especies y cuatro híbridos naturales, por ende, son un elemento sobresaliente de la orquideoflora en los bosques mexicanos (Halbinger y Soto, 1997; Salazar *et al.*, 2014; Solano *et al.*, 2019).

Laelia furfuracea Lindl., se conoce como Lirio de San Francisco, monja e “ita ndeka” morada “flor morada que crece en el roble”. Es endémica de la Sierra Madre del Sur, y su presencia se ha registrado en ciertas localidades del estado de Oaxaca, en bosques de pino-encino. Es una planta epífita de porte simpodial, su periodo de floración inicia en octubre y culmina en diciembre, incluso puede perdurar hasta enero y sus flores varían de un color rosa pálido a rosa oscuro (Halbinger y Soto, 1997; Espejo, 2012; Solano *et al.*, 2019).

Prosthechea karwinskii

El género *Prosthechea* cuenta con alrededor de 90 especies, que se distribuyen en Centroamérica. *Prosthechea karwinskii* (Mart.) Soto Arenas & Salazar, se conoce como lirio amarillo en los Valles Centrales, Oaxaca, “ita ndeka” amarilla o “ita nchaca cuan” en la Mixteca, Oaxaca, monja o monjita amarilla y flor castigada en Oaxaca, Oax., cebolla en Guerrero y corpus amarillo en Michoacán (Silva, 2019).

Es una orquídea endémica del sur de México, y hasta hace poco se confundía con *P. citrina*. Crece en la Sierra Madre del Sur y en el Eje Volcánico Transversal. Se establece en bosques de encino y pino-encino y se distribuye en Michoacán, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Puebla y en Veracruz, aunque en este último estado, parece haberse extinguido. Mientras que en Guerrero y en Oaxaca se concentran las poblaciones mejor conservadas. Es una epífita de porte simpodial y su floración ocurre a finales de febrero y a principios de mayo, sus flores son de un color amarillo intenso, las cuales emanan un aroma cítrico (Espejo, 2012; Silva, 2019).

Rhynchostele aptera

Rhynchostele es un género formado por 17 especies, en su mayoría endémicas de México, solo tres especies se extienden hasta Centroamérica y una de ellas es exclusiva de Costa Rica. No se conoce un nombre común de *Rhynchostele aptera* (Lex.) Soto Arenas & Salazar. Es endémica de México (Espejo, 2012), y se distribuye en Durango, Jalisco, Michoacán, Morelos, Veracruz, Guerrero y en Oaxaca, en bosques húmedos de encino y de pino-encino. Es una planta epífita de porte simpodial, sus flores son blancas con motes pardos y florece de febrero a abril (Jiménez, 1998).

Importancia biocultural de *Laelia*, *Prosthechea* y *Rhynchostele*

Las orquídeas han sido empleadas en ceremonias, en la medicina tradicional y en la alimentación, desde tiempos precolombinos. Diversos grupos étnicos han conservado estos usos, y hoy en día forman parte de su patrimonio biocultural (García-Peña y Peña, 1981; García *et al.*, 2014). El género *Laelia* es apreciado por la belleza de sus flores, por ello, son las especies más utilizadas de la familia Orchidaceae en las festividades religiosas, y se les reconoce como “flores sagradas” (Solano-Gómez *et al.*, 2010; Emeterio-Lara *et al.*, 2016).

Las Laelias se venden en los mercados locales y en los tianguis desde \$ 5.00 pesos mexicanos (Santos *et al.*, 2006; Emeterio-Lara *et al.*, 2016), y en algunas comunidades indígenas se reporta el cultivo de *L. albida*, *L. anceps*, *L. gouldiana*, *L. autumnalis* y *L. furfuracea* (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2012).

Con las flores de *P. karwinskii* se adornan las iglesias en Semana Santa y se prepara el “agua de gloria”, que se utiliza en la procesión de Pascua, en las regiones de la mixteca oaxaqueña (García *et al.*, 2014), y se considera una planta sagrada de la flora nacional (Solano-Gómez *et al.*, 2010; Gómez-Escamilla *et al.*, 2019). A la fecha se comercializa en los mercados del Estado de México (Malinalco), en Morelia y en Oaxaca a precios bajos (Emeterio-Lara *et al.*, 2016). Con respecto a *Rhynchostele aptera* sus flores se utilizan para decorar canastas en Zaachila, Oaxaca (Solano-Gómez *et al.*, 2010).

Conservación de las orquídeas en México

Las orquídeas enfrentan la destrucción de su hábitat, debido al desarrollo de la agricultura y la ganadería (Cruz-García *et al.*, 2015; Fay *et al.*, 2015). Al ser especies sensibles al cambio climático y responder ante las perturbaciones de los ecosistemas que afectan su diversidad y las interacciones ecológicas que establecen con los simbioses y con los polinizadores, se consideran indicadores biológicos (Roberts y Dixon, 2008; Fay y Chase, 2009).

En la NOM-059-SEMARNAT-2010 se tiene el registro de 186 especies, de las cuales 61 están en la categoría de amenazadas, 15 en peligro de extinción, 109 bajo protección especial y una está extinta, del total conocido 73 son endémicas motivo por el cual, son el segundo grupo de plantas con más especies registradas en la norma (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2012).

L. furfuracea y *P. karwinskii* se encuentran entre las especies más vendidas en Oaxaca. *R. aptera* también es ampliamente recolectada y comercializada en sus áreas de distribución natural. Este escenario se encuentra influenciado por el hecho de que estas especies poseen flores de interés hortícola y son utilizadas en diversas festividades (Solano-Gómez *et al.*, 2010; Jiménez-Peña *et al.*, 2018). Pese a la gran extracción que sufre *Laelia furfuracea* y *Rhynchostele aptera* no están registradas en la NOM-059-SEMARNAT-2010, pero sí *Prosthechea karwinskii*.

Simbiosis

La micorriza define la unión entre un hongo y las raíces de una planta (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012), usualmente las micorrizas son de carácter mutualista, donde el micobionte transfiere los nutrientes inorgánicos que toma del suelo, hacia el fitobionte, y a cambio, este le transfiere fotosintatos (Dearnaley y Cameron, 2017). Por esta razón las micorrizas participan de manera activa en el reciclaje de carbono, nitrógeno y fósforo en los ecosistemas (van der Heijden *et al.*, 2015). Se ha estimado que 90 % de las especies vegetales presenta algún tipo de asociación micorrícica, las cuales se clasifican en ectomicorriza, micorriza arbutoide, monotropoide, arbuscular, ericoide y orquideoide (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

Simbiosis orquideoide

Las semillas de las orquídeas son diminutas y presentan un embrión pequeño, que puede constar de diez células, carecen de endospermo y de cotiledones, por lo cual su germinación requiere de

manera obligada de la asociación micorrícica la cual fue descubierta por el botánico francés Noël Léon Bernard en 1899 (Arditti, 1979; Selosse *et al.*, 2011).

Observaciones en *Cattleya aurantiaca* mostraron que su embrión contiene lípidos y proteínas, los cuales están restringidos (Arditti, 1979). En otros estudios se reveló la presencia de pequeñas cantidades de azúcares, granos de almidón y lípidos de reserva. Sin embargo, estos últimos no pueden ser movilizados por la ausencia de glioxisomas y por la baja concentración de azúcares (Arditti, 1979; Smith y Read, 2008).

En el proceso de colonización puede suceder que la semilla no sea infectada o elimine al hongo; que el micobionte parasite y mate al protocormo o que suceda la simbiosis exitosa, cuyo caso se describe a continuación. Aunque los factores de como ocurre este proceso distan mucho de ser totalmente conocidos (Arditti, 1979; Smith y Read, 2008).

En primera instancia la semilla se embebe, se hincha y ocurre la ruptura de la testa (Smith, 1996). Tras la imbibición de la semilla, se cree que pueden liberar amonio al medio y provocar la colonización (Dearnaley y Cameron, 2017). En este momento las hifas penetran las células basales, vía suspensor o pelos epidérmicos, las cuales son invaginadas por la membrana plasmática y el citoplasma del huésped. Una vez que la semilla es colonizada, germina y se forma el protocormo, una masa de células sin forma (Arditti, 1979; Smith y Read, 2008).

En el protocormo las hifas del hongo se propagan de célula a célula, las cuales se van enrollando y forman la estructura característica de esta colonización, los ovillos o pelotones (Arditti, 1979; Smith y Read, 2008). Entre el pelotón y la membrana de la célula se forma un espacio apoplástico (matriz interfacial) donde se considera que ocurre la transferencia de nutrientes (Dearnaley y Cameron, 2017).

Los hongos suministran los carbohidratos al protocormo, mediante las conexiones miceliales (Smith, 1966; van der Heijden *et al.*, 2015) cuando los pelotones son lisados (transferencia necrotrófica), pero también se ha observado que el intercambio sucede cuando las hifas continúan intactas, es decir, con el pelotón sano y no lisado (transferencia biotrófica). Por lo cual, se ha sugerido que es factible una combinación de ambos mecanismos (Smith y Read, 2008; Bougoure *et al.*, 2014; Dearnaley y Cameron, 2017).

Otra posible causa del colapso de las hifas, podría ser una reacción de defensa, ya que las orquídeas producen fitoalexinas, como el orchinol, aislado de *Orchis militaris*; el loroglossol e hircinol aislados de *Loroglossum hircinum* (Blakeman *et al.*, 1976; Arditti, 1979).

En la micorriza orquídeoide participan hongos del filum Basidiomycota, como *Tulasnella*, *Ceratobasidium* y *Serendipita* (*Sebacina*), los cuales pueden ser saprófitos, ectomicorrícicos, endófitos, parásitos y patógenos de plantas; así como, algunos Ascomycota (Bonnardeaux *et al.*, 2007; McCormick *et al.*, 2018). Bernard fue el primero en aislar a *Rhizoctonia* de las raíces de una orquídea (Smith y Read, 2008). Se estima que 9 % de las plantas forman este tipo de asociación, con la participación de más de 25 000 especies de hongos (Brundrett, 2009; van der Heijden *et al.*, 2015).

Nutrición en las orquídeas

La nutrición en las orquídeas es muy peculiar, en un principio todas son micoheterotróficas, ya que dependen de un hongo en su totalidad para la obtención de nutrimentos (Rasmussen, 2002; van der Heijden *et al.*, 2015). Cuando el protocormo se desarrolla y se forman las hojas verdes, entonces ocurre un proceso irreversible y las plántulas se vuelven fotosintéticas (Rasmussen y Rasmussen, 2007; Smith y Read, 2008). Sin embargo, existen orquídeas que al no poder realizar la fotosíntesis (aclorofilas) en su etapa adulta, siempre serán micoheterotróficas (Smith y Read, 2008). Por esta razón al considerar todo el ciclo de vida de las orquídeas, nunca en su totalidad son autótrofas y se ha considerado que incluso algunas orquídeas verdes dependen tanto de sus simbiontes como de la fotosíntesis que efectúan (un fenómeno denominado mixotrofia) durante todo su ciclo de vida (Rasmussen y Whigham, 2002; Rasmussen y Rasmussen, 2007; Smith y Read, 2008).

Evidencia del transporte bidireccional de nutrientes

Hasta hace algunos años, se consideraba que el protocormo dependía de los nutrimentos proporcionados por el hongo, el cual no recibía nada a cambio (Dearnaley y Cameron, 2017). Sin embargo, estudios efectuados en *Goodyera repens* demostraron que alrededor de 3 % del carbono es transferido de la orquídea fotosintética hacia el micelio del hongo *Ceratobasidium cornigerum*. Simultáneamente, se ha demostrado que existe la movilización de nitrógeno y de fósforo del simbionte fúngico hacia la orquídea verde *G. repens* (Cameron *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2007).

También se ha observado que *Tulasnella calospora* es capaz de movilizar el nitrógeno en forma de aminoácidos y amonio (NH₄), pero no el nitrato (NO₃) hacia *Serapias vomeracea*. Lo que sugiere que estos hongos son capaces de utilizar el nitrógeno en su forma orgánica e inorgánica (Fochi *et al.*, 2017). En el protocormo de *Spiranthes sinensis* se demostró que la transferencia de carbono y nitrógeno a partir del simbionte *Ceratobasidium* sp. sucede a través de los pelotones digeridos y no digeridos (Kuga *et al.*, 2014).

Aunque los mecanismos de absorción y transferencia de carbono, nitrógeno y fósforo entre las orquídeas y los hongos no están del todo claros, se ha demostrado en algunos casos que esta simbiosis establece un verdadero mutualismo, ya que ambos organismos se benefician a lo largo de la asociación protocormo-planta adulta, por lo tanto, comparte esta característica con las asociaciones arbusculares y las ectomicorrizales (Dearnaley y Cameron, 2017).

Interacción rizobacterias-orquídeas

Las rizobacterias estimulan el crecimiento, desarrollo y la productividad de las orquídeas, mediante mecanismos directos e indirectos. Los directos incluyen la solubilización de nutrientes como el hierro y el fósforo (Tsavkelova *et al.*, 2005; Lugtenberg y Kamilova, 2009), la síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico) (Wilkinson *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2014), y la fijación de nitrógeno atmosférico (Lange y Moreira, 2001; Wang *et al.*, 2016; Alibrandi *et al.*, 2020). En las orquídeas el estudio de la interacción con las rizobacterias inició con Knudson en 1922 (Teixeira da Silva *et al.*, 2015). La colonización bacteriana comienza cuando los rizoides emergen del protocormo y atraen a las bacterias mediante la producción de exudados: azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y diversos metabolitos secundarios (Tsavkelova *et al.*, 2016; Pavlova *et al.*, 2017).

Con respecto al comportamiento de la comunidad bacteriana se reconoce que las orquídeas epífitas presentan mayor diversidad, en relación a las orquídeas terrestres (Galdiano Júnior *et al.*, 2011). Esta característica se adjudica a la presencia del velamen, el cual proporciona el nicho ecológico adecuado para el establecimiento no solo de bacterias sino también de hongos y cianobacterias (Tsavkelova *et al.*, 2007; Shekhovtsova *et al.*, 2013). Aunado a esto se ha considerado que en estas especies el rizoplano es la zona con mayor diversidad microbiana y no la rizosfera, como en las demás especies vegetales (Tsavkelova *et al.*, 2004; Alibrandi *et al.*, 2020).

En las orquídeas, la presencia de rizobacterias varía en función de su hábito de crecimiento, su fenología (Tsavkelova *et al.*, 2007), y factores ambientales (temperatura, luz, y humedad), que prevalecen en el nicho ecológico en el que se desarrollan (Wilkinson, 1989; Tsavkelova *et al.*, 2004; Esposito-Polesi *et al.*, 2017). En diversos estudios se ha demostrado que no existe especificidad entre los socios bacterianos y las orquídeas involucradas (Wilkinson, 1989; Tsavkelova *et al.*, 2016; Pavlova *et al.*, 2017). También se ha mencionado que la inoculación con rizobacterias ha resultado ser una técnica exitosa, con la que se ha logrado estimular la germinación de semillas y la aclimatación de plántulas de diversas especies vegetales. Sin embargo, en las orquídeas ha sido poco utilizada, a pesar de que podría constituir una herramienta muy útil en la propagación y en la conservación exitosa de especies en peligro de extinción (Galdiano Júnior *et al.*, 2011; Pavlova *et al.*, 2017). Actualmente, los estudios se han enfocado en la localización e identificación de bacterias que sintetizan el AIA, mientras que las rizobacterias que solubilizan los fosfatos y con la capacidad de fijar nitrógeno, han sido poco exploradas (Shekhovtsova *et al.*, 2013; Esposito-Polesi *et al.*, 2017; Alibrandi *et al.*, 2020).

Literatura Citada

- Alibrandi, P., Monaco, N., Calevo, J., Voyron, S., Puglia, A. M., Cardinale, M., & Perotto, S. (2020). Plant growth potential of bacteria endophytes from three terrestrial mediterranean orchid species. *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-12.
- Arditti, J. (1979). *Advances in botanical research*. Vol. 7. London: Academic Press. Aspects of the Physiology of Orchids; p.422-655.
- Beltrán-Rodríguez, L. A., Martínez-Rivera, B., & Paulo, A. (2012). Etnoecología de la flor de Catarina – *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. – (Orchidaceae) en una comunidad campesina al sur del estado de Morelos, México: Conservando un recurso y preservando saberes populares. *Etnobiología*, 10(1), 1-17.
- Beutelspacher, C. R. (2012). *Esplendor de las orquídeas de Chiapas*. México: CONACULTA.
- Blakeman, J. P., Mokahel, M. A., & Hadley, G. (1976). Effect of mycorrhizal infection on respiration and activity of some oxidase enzymes of orchid protocorms. *New Phytologist*, 77, 697-704.
- Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., & Sivasithamparam, K. (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research*, 111(Pt 1), 51-61.

- Bougoure, J., Ludwig, M., Brundrett, M., Cliff, J., Clode, P., Kilburn, M., & Grierson, P. (2014). High-resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco-heterotrophic orchid. *Plant, Cell and Environment*, *37*, 1223-1230.
- Brundrett, M. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil*, *320*, 37-77.
- Camargo-Ricalde, S. L., & Esperón-Rodríguez, M. (2005). Efecto de la heterogeneidad espacial y estacional del suelo sobre la abundancia de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares en el valle semiárido de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Revista de Biología Tropical*, *53*, 339-352.
- Cameron, D. D., Johnson, I., Leake, J. R., & Read, D. J. (2007). Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*, *99*(5), 831-834.
- Cameron, D. D., Leake, J. R., & Read, D. J. (2006). Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist*, *171*(2), 405-416.
- Cruz-García, G., Lagunez-Rivera, L., Chávez-Ángeles, M. G. & Solano-Gómez, R. (2015). The Wild Orchid Trade in a Mexican Local Market: Diversity and Economics. *Economic Botany*, *69*(4), 291-305.
- de la Rosa-Manzano, E., Andrade, J. L., Zotz, G., & Reyes-García, C. (2014). Epiphytic orchids in tropical dry forests of Yucatan, México – Species occurrence, abundance and correlations with host tree characteristics and environmental conditions. *Flora*, *209*(2), 100-109.
- de la Rosa-Manzano, E., Andrade, J. L., Zotz, G., & Reyes-García, C. (2017). Physiological plasticity of epiphytic orchids from two contrasting tropical dry forests. *Acta Oecologica*, *85*, 25-32.
- Dearnaley, J., & Cameron, D. (2017). Nitrogen transport in the Orchid Mycorrhizal symbiosis—further evidence for a mutualistic association. *New Phytologist*, *213*, 10-12.
- Emeterio-Lara, A., Palma-Linares, V., Vázquez-García, L. M., & Mejía-Carranza, J. (2016). Uso y comercialización de orquídeas silvestres en la región sur del Estado de México. *Polibotánica*, *42*, 197-214.
- Espejo, S, A. (2012). El endemismo en las Liliopsida mexicanas. *Acta Botánica Mexicana*, (100), 195-257.
- Esposito-Polesi, N. P., de Abreu-Tarazi, M. F., de Almeida, C. V., Tsai, S. M., & de Almeida, M. (2017). Investigación of endophytic bacterial Community in supposedly axenic cultures of pineapple and orchids with evidence on abundant intracellular bacteria. *Current Microbiology*, *74*(1), 103-113.

- Fay, M. F., & Chase, M. W. (2009). Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. Preface. *Annals of Botany*, 104(3), 359-364.
- Fay, M. F., Pailler, T., & Dixon, K. W. (2015). Orchid conservation: making the links. *Annals of Botany*, 116(3), 377-379.
- Fochi, V., Chitarra, W., Kohler, A., Voyron, S., Singan, V., Lindquist, E., Barry, K., Girlanda, M., Grigoriev, I., Martin, F., Balestrini, R., & Perotto S. (2017). Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora-Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 213, 365-379.
- Galdiano Júnior, R., Pedrinho, E., Castellane, T. C., & Lemos, E. (2011). Bactérias produtoras de auxinas isoladas de raízes de *Cattleya walkeriana*, orquídea Brasileira ameaçada de extinção, e sua função na aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35(3), 729-737.
- García, G., Solano, R., & Lagunez, L. (2014). Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec Community in Mexico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 153-158.
- García-Peña, M. R., & Peña, M. (1981). Uso de las orquídeas en México desde la época prehispánica hasta nuestros días. *Orquídea* (Méx.), 8(1), 59-75.
- Gómez-Escamilla, I. N., Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A. R., & Krömer, T. (2019). Distribución geográfica de angiospermas epífitas de la región terrestre prioritaria Negro-Yucaño, Oaxaca, México. *Revista de Biología Tropical*, 67(1), 118-131.
- Halbinger, F., & Soto, M. (1997). Laelias of México. *Orquídea* (Méx.), 15, 1-160.
- Honrubia, M. (2009). Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 66S1, 133-144.
- Jiménez, M., Sánchez, S., & García-Cruz, J. (1998). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Familia Orchidaceae. Fascículo, 67, 1-83.
- Jiménez-Peña, N., Trejo-Téllez, L. I., & Juárez-López, P. (2018). Concentración de macronutrientes en órganos de tres especies silvestres de *Rhynchosstele* en su hábitat natural. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(5), 971-980.
- Kuga, Y., Sakamoto, N., & Yurimoto, H. (2014). Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*, 202(2), 594-605.
- Lange, A., & Moreira, F. M. (2002). Detecção de *Azospirillum Amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26, 529-533.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.

- McCormick, M. K., Whigham, D. F., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219(4), 1207-1215.
- Menchaca, R. A. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas*. México: CONAFOR.
- Pavlova, A. S., Leontieva, M. R., Smirnova, T. A., Kolomeitseva, G. L., Netrusov, A. I., & Tsavkelova, E. A. (2017). Colonization strategy of the endophytic plant growth promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. *Journal Applied Microbiology*, 123, 217-232.
- Rasmussen, H., & Rasmussen, F. (2007). Trophic relationships in Orchid mycorrhiza – diversity and implications for conservation. *Lankesteriana*, 7(1-2), 334-341.
- Rasmussen, H., & Whigham, D. (2002). Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist*, 154, 797-807.
- Rittershausen, B., & Rittershausen, W. (2014). *Orquídeas Enciclopedia práctica*. Madrid: LIBSA.
- Roberts, D. L., & Dixon, K. W. (2008). Orchids. *Current Biology*, 18(8), 325-329.
- Salazar, G., Jiménez-Machorro, R., Huerta, H. M., & Hágsater, E. (2014). A new species and a new natural hybrid of *Laelia* (Orchidaceae) from Oaxaca, México. *Phytotaxa*, 178(1), 161-170.
- Santos, L., Aguirre, E., Campos, J. E., & Martínez, M. (2006). Conservación *in situ* de la flora mexicana: La orquídea *Laelia albida*, en una reserva de la biosfera. *Ciencia y desarrollo en internet*, 2-10.
- Selosse, M.-A., Boullard, B., & Richardson, D. (2011). Noël Bernard (1874-1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. *Symbiosis*, 54(2), 1-9.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. [consultado el 10 de enero de 2020]. <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-059-semarnat-2010>.
- Shekhovtsova, N., Marakaev, O., Pervushina, K., & Osipov, G. (2013). The underground organ microbial complexes of moorland spotted orchid *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 35-42.
- Silva, M. I. (2019). *Aislamiento y determinación de la estructura molecular de metabolitos secundarios de Prosthechea karwinskii* (Orchidaceae) (Tesis de maestría). UNAM, CDMX.
- Smith, S. E. (1966). Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist*, 65, 488-499.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Third Edition. London: Academic Press. Chapter 12, The mycorrhizas of green orchids; p.419-457.

- Solano, R., Huerta-Espinoza, H., Cruz-García, G., & Ortiz-Riveros, F. (2019). A new natural hybrid in the genus *Laelia* (Orchidaceae) from Oaxaca, México. *Phytotaxa*, 402(5), 232-240.
- Solano-Gómez, R., Cruz, G., Martínez, A., & Lagunez, L. (2010). Plantas utilizadas en la celebración de semana santa en Zaachila, Oaxaca, México. *Polibotánica*, (29), 26.
- Soto-Arenas, M. A., Solano, R., & Hágsater, E. (2007). Risk of extinction and patterns of diversity loss in mexican orchids. *Lankesteriana*, 7(1-2), 114-121.
- Stancato, G. C., Mazzafera, P., & Buckeridge, M. S. (2001). Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 1009-1016.
- Teixeira da Silva, J. A., Tsavkelova, E. A., Zeng, S., Bun, T., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Rao, M. V. (2015). Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242, 1-22.
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M. A. A., & Escobar-Aguayo, J. J. (2017). Estado de conservación de orquídeas silvestres (Orchidaceae). *Agroproductividad*, 10(6), 3-12.
- Téllez, M. A. A. (2011). *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México*. México: UACH.
- The Plant List. (2013). Version 1.1. [consultado el 15 de febrero de 2020]. <http://www.theplantlist.org/>.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2004). Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiology*, 73, 2710-715.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2005). Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*, 74, 46-53.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., & Netrusov, A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 162, 69-76.
- Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Leontieva, M. R., Malakho, S. G., Kolomeitseva, G. K., & Netrusov, A. I. (2016). *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria. *Plant Growth Regulation*, 80, 79-91.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, Y. S., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical Use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126.
- van der Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M.-A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423.

- Villaseñor, J. L. (2003). Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia*, 28(3), 160-167.
- Wang, X., Yam, T. W., Meng, Q., Zhu, J., Zhang, P., Wu, H., Wang, J., Zhao, Y., & Song, X. (2016). The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under in vitro culture conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 126, 523-531.
- Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (1989). Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytologist*, 112, 429-435.
- Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K., & Ghisalbert, E. L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and Soil*, 159, 291-295.
- Yang, S., Zhang, X., Cao, Z., Zhao, K., Wang, S., Chen, M., & Hu, X. (2014). Growth-promoting *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation. *Microbial biotechnology*, 7(6), 611-620.
- Zotz, G., & Winkler, U. (2013). Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia*, 171, 733-741. Fay, M. F., Pailler, T., & Dixon, K. W. (2015). Orchid conservation: making the links. *Annals of Botany*, 116(3), 377-379.

CAPÍTULO I. COLONIZACIÓN EN TRES ORQUÍDEAS ENDÉMICAS DE MÉXICO

Claudia García Sánchez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

1.1 RESUMEN

Orchidaceae enfrenta problemas de conservación y, en consecuencia, toda la familia está incluida en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de especies amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Las orquídeas epífitas entablan una relación estrecha con el forófito que les brinda el microclima propicio para su desarrollo, y para ello, han tenido que adquirir adaptaciones morfológicas y fisiológicas, que han hecho posible su adaptación al ámbito epifítico. Entre estas adaptaciones se reconoce la simbiosis que forman con ciertos hongos, esenciales para la germinación de sus semillas y su desarrollo. México cuenta con una gran diversidad de orquídeas, entre ellas, las especies de interés en este estudio: *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* y *Rhynchostele aptera*, de importancia económica, medicinal y ceremonial. El objetivo de estudio fue cuantificar la intensidad y la extensión de la colonización en las raíces de estas especies. La colecta se realizó en bosques de pino-encino, en tres comunidades de Oaxaca. En *L. furfuracea* se evaluaron 36 raíces, las cuales se clasificaron en diferentes edades: jóvenes, maduras y senescentes y, estas raíces se seccionaron en tres áreas equidistantes: proximal, central y distal. En *P. karwinskii* se seleccionaron 15 raíces de edad madura que estuvieron en contacto con la corteza del hospedero, este esquema de clasificación fue igual para *R. aptera*. Se realizaron cortes transversales con navajas Gillette®, los cuales se montaron en portaobjetos, se tiñeron con fucsina ácida, y después de 24 horas se evaluó la colonización. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza y la prueba de Tukey con una $p \leq 0.05$ en el programa SAS®. En *L. furfuracea* el grado de colonización varío en función de la edad de las raíces, y fue mayor en las raíces maduras (38 %), superando estadísticamente a las raíces senescentes y jóvenes. La colonización fluctuó a lo largo de las raíces y fue más intensa en el tejido cortical central de las raíces maduras, en contraste la colonización disminuyó en el área proximal de todas las raíces. *P. karwinskii* se colectó en dos comunidades y la colonización fluctuó entre 65 y 68 %, pero no se encontró diferencia significativa entre ambas comunidades, mientras que en *R. aptera* la colonización fue de 48 %.

Palabras clave: Conservación, fenología de la raíz, materia orgánica, orquideoide y pelotones.

CHAPTER 1. MYCORRHIZAL COLONIZATION IN THREE EPIPHYTIC ORCHIDS ENDEMIC FROM MEXICO

Claudia García Sánchez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

1.2 ABSTRACT

Currently the Orchidaceae family faces strong conservation problems and, consequently, the entire family is included in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Epiphytic orchids establish a close relationship with the phorophyte which provides a unique microclimate which influences in their development; for this reason, they have acquired morphological and physiological adaptations, which have made possible their adaptation to the harsh epiphytic habit. Among these adaptations, they establish a specific mycorrhizal symbiosis which are essential for their seed germination and development. Mexico has great diversity of orchids, including the studied species *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* and *Rhynchostele aptera*, which have economic, medicinal and ceremonial importance. The objective of the study was to evaluate the mycorrhization in the roots of these species. The collection was carried out in pine-oak forests, in three communities in Oaxaca. In *L. furfuracea*, 36 roots were evaluated, which were classified into different ages: young, mature and senescent, and these roots were divided into three equidistant areas: initial, central and terminal. In *P. karwinskii* 15 roots were selected, of mature age that were in contact with the host's bark, this classification scheme was the same for *R. aptera*. Cross sections were made with Gillette® blades, which were mounted on slides, stained with acid fuchsin, and after 24 h the mycorrhizal colonization was evaluated. An analysis of variance and Tukey's test were applied to the data obtained with a $p \leq 0.05$ in the SAS® program. Mycorrhization in *L. furfuracea* varied depending on the age of the roots, and was higher in mature roots (38 %), compared to senescent and young roots. The infection fluctuated along the roots and was more intense in the proximal area to the centre of the pseudobulbs. *P. karwinskii* was collected in two communities and the infection fluctuated between 65 and 68 %, but no significant difference was found between both communities. Finally, in *R. aptera* the colonization was 48 %.

Keywords: Conservation, root phenology, organic matter, coils and symbiosis.

1.3 INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente las orquídeas enfrentan problemas de conservación, ya que sus poblaciones disminuyen por la deforestación de los bosques, el desarrollo de la agricultura, la ganadería, y el saqueo (Fay *et al.*, 2015). Lo que ha llevado a que toda la familia esté incluida en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de especies amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) (Fay y Chase 2009).

Las orquídeas poseen adaptaciones morfológicas que les permite desarrollarse en el ámbito epífita, las hojas están protegidas por ceras que evitan la pérdida de agua, los estomas están hundidos (de la Rosa-Manzano *et al.*, 2014), los tallos suculentos almacenan el agua y los carbohidratos (Stancato *et al.*, 2001), el velamen que recubre las raíces, evita la desecación y permite la absorción de agua y nutrimentos y su metabolismo es ácido crasuláceo (CAM) (Zotz y Winkler, 2013).

El hospedero crea un microclima favorable para el desarrollo de estas especies (Bergstrom y Carter, 2008), incluso se ha propuesto que algunas orquídeas epífitas están asociadas a un forófito específico, el cual brinda las condiciones adecuadas para el establecimiento de los simbioses (Otero *et al.*, 2007; Zettler *et al.*, 2011). La composición química de la corteza y las propiedades físicas, como la textura, el grosor y la capacidad de retener agua, pueden afectar la germinación de los hongos y el desarrollo de las semillas de las orquídeas (Bergstrom y Carter, 2008; Harshani *et al.*, 2013).

Las semillas de las orquídeas carecen de endospermo y en su germinación participan hongos saprófitos, ectomicorrícicos, endófitos y fitopatógenos del filum Basidiomycota y algunos Ascomycota (Bonnardeaux *et al.*, 2007; McCormick *et al.*, 2018). Las hifas del hongo penetran las células y dentro de ellas, se enrollan para formar los pelotones y así colonizan el protocormo (Smith y Read, 2008). El intercambio nutrimental se ha observado con los pelotones lisados y no lisados, y se ha llegado a sugerir la combinación de ambos mecanismos (Bougoure *et al.*, 2014). Entre el hongo y la orquídea sucede la transferencia de carbono, nitrógeno y fósforo a lo largo de su asociación protocormo-planta adulta, por ello, la micorriza orquideoide se considera un mutualismo verdadero (Cameron *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2007).

L. furfuracea, *P. karwinskii* y *R. aptera* se extraen en grandes cantidades, debido a los usos y costumbres de las comunidades que se han establecido en las cercanías de los bosques en donde

se localizan, lo que podría llegar a afectar a las comunidades vegetales. Hay que destacar que las tres especies son endémicas de México, y que *L. furfuracea* es de distribución restringida, ya que solo se localiza en el estado de Oaxaca. En particular, el estudio de los simbiosntes en las orquídeas se ha desarrollado poco en México, y en las especies de interés, no se han realizado investigaciones en este rubro. Por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar la intensidad y la extensión de la colonización en el tejido cortical de las raíces en estas orquídeas. En el caso de *L. furfuracea*, se evaluaron raíces en diferentes estados fenológicos: jóvenes, maduras y senescentes, así como, distintas áreas de las raíces: proximal, central y distal, considerando la base del pseudobulbo de la orquídea. En *P. karwinskii* se evaluó si la colonización en el tejido cortical varió con respecto a las dos áreas de colecta: Santa Catarina Estetla y La Purísima Concepción, y se comparó el grado de colonización entre *P. karwinskii* de las dos comunidades y *R. aptera*.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Colecta del material vegetal

Laelia furfuracea Lindl., se colectó en enero de 2018 en la comunidad de Santa Catarina Estetla, ubicada en el municipio de Santa María Peñoles, Oaxaca, en las coordenadas geográficas 17° 16.593' N y 97° 38.132' O a una altitud de 2 150 m. *Prosthechea karwinskii* (Mart.) Soto Arenas & Salazar, se colectó en marzo de 2018 en dos comunidades de Oaxaca: en Santa Catarina Estetla y en La Purísima Concepción, en La Heroica Ciudad de Tlaxiaco, a 17° 16' 27.9'' N y 97° 38' 30.9'' O a una altitud de 2 160 m (Figura 1).

Mientras que *Rhynchostele aptera* (Lex.) Soto Arenas & Salazar es originaria de la comunidad de Ndoyocoyo, en el municipio de San Esteban Atlatlahuca, Tlaxiaco, situada a 17° 06' 45'' N y 97° 43' 59.9'' O a una altitud de 2 520 m. Esta planta fue una donación del Mtro. Daniel Bautista Avendaño, en julio de 2018.

Para ingresar al bosque de Santa Catarina Estetla se requirió el permiso de las autoridades comunales y en el recorrido nos acompañó un habitante de la zona, quien conocía la ubicación de las orquídeas. Tanto *L. furfuracea* como *P. karwinskii* provienen de bosques de pino-encino y crecen sobre los encinos (*Quercus* sp.), acompañadas de líquenes, helechos y bromelias, incluso se observó que ambas especies crecen en el mismo forófito.



Figura 1.1. Colecta del material vegetal. A) bosque en la comunidad de Santa Catarina Estetla; B) colecta de *L. furfuracea*; C) bosque en la comunidad de La Purísima Concepción; D) colecta de *P. karwinskii*.

Las raíces de *L. furfuracea* se desarrollan sobre la corteza y se pudieron obtener raíces completas, en cambio, las raíces de *P. karwinskii* se extienden entre y por debajo de la corteza, por ello, las raíces que se tomaron estaban incompletas o dañadas, sin el velamen. Se colectaron tres plantas de cada especie, las cuales se caracterizaron por presentar de diez a quince pseudobulbos. Cada una de ellas, se desprendió con la mano, y se guardaron en bolsas de papel para su transporte y posterior tratamiento en el laboratorio de Microbiología, en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, Texcoco, estado de México.

1.4.2 Clasificación de las raíces para su análisis

En el laboratorio se seleccionaron raíces completas, con el velamen íntegro y sin ningún daño mecánico aparente. Las raíces se cortaron desde la base del pseudobulbo con navajas Gillette®, y se lavaron con agua purificada. En *L. furfuracea* se eligieron doce raíces maduras y doce raíces senescentes, aunado a esto, las plantas se conservaron vivas en las instalaciones y después de un mes se observó el brote de raíces jóvenes, de estas se eligieron doce raíces y se realizó el procedimiento mencionado. Las raíces se clasificaron en tres etapas fenológicas: jóvenes, maduras y senescentes:

- 1) En las raíces jóvenes se observó un velamen blanquecino, turgente y de consistencia esponjosa al tacto, y como las raíces estaban en crecimiento, es característico que el ápice presentara una coloración verduzca.
- 2) En las raíces maduras se apreció un velamen de color amarillo-café claro, turgente y de consistencia medianamente esponjosa.
- 3) Mientras que las raíces senescentes exhibían un velamen de color café oscuro, sin turgencia y su consistencia era coriácea.

Cabe aclarar que las raíces maduras y senescentes estaban presentes cuando se colectaron las orquídeas en campo, mientras que las raíces jóvenes crecieron en condiciones asépticas. Las raíces clasificadas por su fenología se seccionaron en tres áreas equidistantes: 1) área proximal, 2) área central y 3) área distal. Esta segmentación se consideró a partir de la base del pseudobulbo (tallo modificado de las orquídeas epífitas), hacia el ápice o parte final de cada una de las raíces. Solo en *L. furfuracea* fue posible hacer esta clasificación, ya que se colectaron raíces completas.

En cambio, debido a las condiciones en las que se desarrollan las raíces *P. karwinski*, fue posible analizar un solo tipo de raíz: 1) Raíces maduras con presencia de restos orgánicos. En esta especie se analizaron quince raíces de las plantas colectadas en Santa Catarina Estetla y quince raíces de las plantas provenientes de la comunidad La Purísima Concepción.

En *R. aptera* se analizaron quince raíces maduras que crecieron en contacto con la corteza del encino. Esta especie fue una donación y solo se proporcionó una planta montada en un tronco, la cual se rescató del bosque, ya que en esta zona las personas utilizan los encinos para la producción de carbón.

1.4.3 Tinción y colonización

Las raíces se colocaron en cajas de Petri con agua destilada durante quince minutos, con la finalidad de reblandecer el tejido y retirar los residuos de corteza y musgo, presentes en las raíces maduras y senescentes, ya que las raíces jóvenes estaban libres de restos orgánicos. Se tomó cada una de las raíces y de acuerdo a la clasificación empleada, se realizaron cortes transversales de aproximadamente 1 mm de espesor con navajas para afeitar Gillette®.

Los cortes seleccionados al azar se colocaron sobre los portaobjetos y con un gotero se adicionó el colorante. Para la tinción se utilizó fucsina ácida Meyer® al 0.01 % p/v diluida en ácido láctico,

glicerol y agua destilada en la proporción 14:1:1 (Rasmussen y Whigham, 2002). Después de 24 horas se procedió a observar las muestras teñidas en un microscopio óptico Leica® a 10x y 40x.

En la evaluación de la colonización se empleó el método propuesto por Rasmussen y Whigham (2002). Es una escala visual, que consiste en fraccionar el cortex de cada una de las muestras en cuadrantes imaginarios. Se inició en 0 % (sin colonización), seguido de 12.5 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % (todo el tejido cortical ocupado por pelotones fúngicos). También se registró el número total de cortes realizados, en cada uno de ellos se identificó la presencia o ausencia de los simbiontes y de este modo conocer que tanto se extendió la colonización a lo largo de las raíces analizadas. Ambos datos son complementarios, ya que el primero nos mostró el porcentaje del tejido cortical que es ocupado por los simbiontes, y en el segundo caso se indicó que tanto se propagó la colonización a lo largo de las raíces.

1.4.4 Análisis estadístico

En *L. furfuracea* se realizó un análisis de varianza con los resultados obtenidos de las dos variables de estudio edad y área de la raíz, y en *P. karwinskii* y *R. aptera* se efectuó un ANOVA de una vía, ya que solo se examinó un tipo de raíz (raíces maduras con restos orgánicos). Así como, una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), para registrar cómo influyen las variables de estudio en la colonización de las especies en estudio. Las pruebas estadísticas se efectuaron con el programa SAS® versión 9.0.

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó la presencia y la distribución de los hongos orquideoides en las epífitas: *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* y *Rhynchostele aptera*, y en cada uno de los casos se encontró que el tejido cortical de las raíces es colonizado por estos microorganismos.

En *L. furfuracea*, se analizaron raíces de diferentes edades (jóvenes, maduras y senescentes) y se encontró que son colonizadas por estos hongos, y que la colonización varió en función a la fenología de la raíz. En este caso se observó que las raíces maduras son las más colonizadas con 38 %, seguidas de las raíces senescentes con 18 %, y las raíces jóvenes fueron escasamente colonizadas, en menos del 1 % de su tejido cortical. Los resultados indican que las raíces maduras son más colonizadas y superan estadísticamente a las raíces senescentes y a las raíces jóvenes, con una ($p \leq 0.05$) (Figura 2).

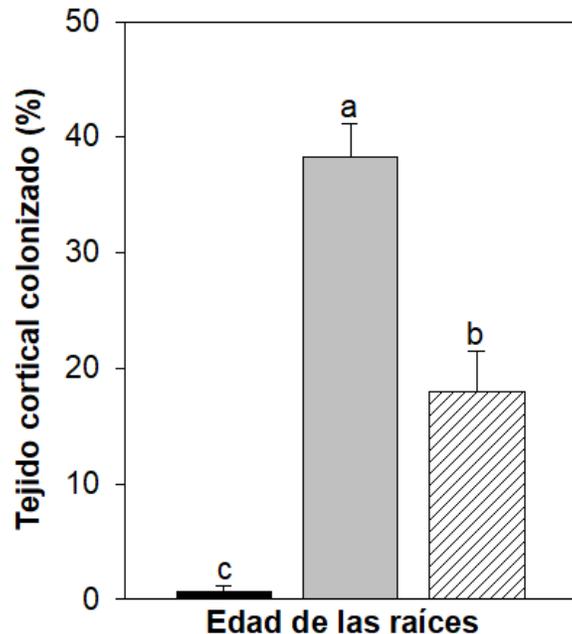


Figura 1.2. Porcentaje de la colonización en el tejido cortical en las raíces de diferentes edades en *L. furfuracea*. Raíces jóvenes = barra negra; raíces maduras = barra gris; raíces senescentes = barra con diagonales. Los valores son medias \pm el error estándar, y aquellos con la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$); n = 540; Diferencia Mínima Significativa = 8.92.

Una medida complementaria a la proporción del tejido cortical colonizado por pelotones, es la propagación de la colonización, que considera el número total de muestras o cortes realizados. En *L. furfuracea* se contabilizaron 1 620 segmentos de raíces, y en ellos se registró una extensión de 92 % en las raíces senescentes, 89 % en las raíces maduras y 1 % en las raíces jóvenes.

Esto pudo suceder porque las raíces maduras y senescentes estuvieron en contacto directo con los restos orgánicos que se depositaron en la corteza de los encinos, mientras que las raíces jóvenes crecieron en ausencia de la materia orgánica y de su forófito. Investigaciones realizadas en otras especies de orquídeas epífitas mencionan que las raíces viejas o longevas presentan colonizaciones más intensas que las raíces jóvenes (Raman y Nagarajan, 1999; Bertolini *et al.*, 2014). Ya que la colonización de estos hongos se propaga en las raíces que han estado en contacto con el sustrato presente en las ramas de los árboles u otras raíces micorrizadas (Bermudes y Benzing, 1989; Hossain, 2019). En contraste, las raíces que no entran en contacto con su hospedero, no son colonizadas (Raman y Nagarajan, 1999), o pueden llegar a presentar colonizaciones esporádicas, menores al 1 %, como en este caso.

Entre los primeros reportes de orquídeas epífitas, se encontraron colonizaciones eventuales y menores al 1 % (Hadley y Williamson, 1972). Pero, en años posteriores, se ha demostrado que diversas especies de orquídeas epífitas son colonizadas de manera variable y se han reportado colonizaciones que van desde el 10 % hasta casi el 100 % en su tejido cortical; tanto en especies cultivadas en invernadero, en Nueva Zelanda (Bagyaroj y Powel, 1983); y en su hábitat natural: en Ecuador (Bermudes y Benzing, 1989), en Costa Rica (Lesica y Antibus, 1990), en India (Raman y Nagarajan, 1999; Sathiyadash *et al.*, 2012), en México (Cruz, 2007; Jiménez, 2013; Bertolini *et al.*, 2014), y en Bangladesh (Hossain, 2019).

Al considerar cada una de las áreas (proximal, central y distal) de la raíz, se observó que la colonización fluctuó a lo largo de ellas, y fue más intensa en el tejido cortical central de las raíces maduras (50 %), que fue estadísticamente mejor ($P \leq 0.05$), seguida del área distal de las raíces maduras (34 %) y senescentes (36 %), y el área proximal de las raíces maduras (30 %), en contraste la colonización disminuyó en el área proximal de las raíces jóvenes y senescentes. Al relacionar el área de la raíz con su edad, se encontró que la colonización fue escasa en las raíces jóvenes, como una consecuencia directa de la ausencia de restos orgánicos, ya que estas raíces no estuvieron en contacto con la corteza de los encinos. En comparación a las raíces maduras y senescentes, las cuales sí crecieron sobre las ramas de su hospedero (Figura 3).

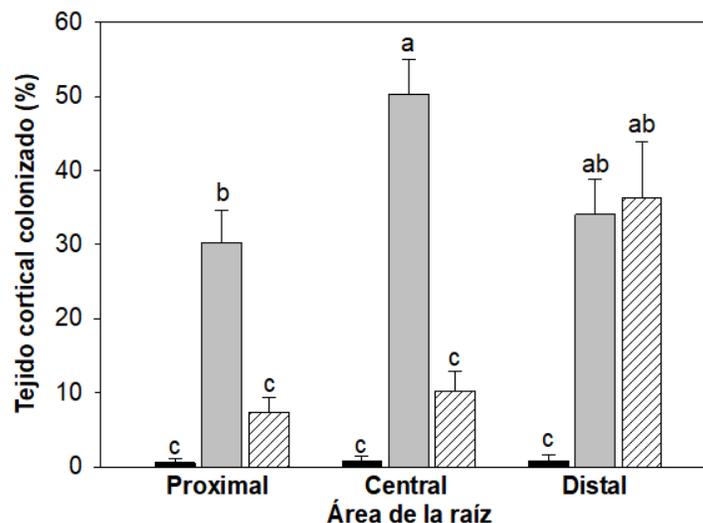


Figura 1.3. Porcentaje del tejido cortical colonizado en las diferentes áreas de las raíces: proximal, central y distal, en las raíces de diferentes edades de *L. furfuracea*. Raíces jóvenes = barra negra; raíces maduras = barra gris; raíces senescentes = barra con diagonales. Los valores son medias \pm el error estándar, y aquellos con la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$); $n = 180$; Diferencia Mínima Significativa = 17.35.

El patrón de distribución se atribuye a que el área central y distal de las raíces son una zona de crecimiento estable y madura, en comparación al área proximal que es joven y está en desarrollo constante (Raman y Nagarajan, 1999; Bertolini *et al.*, 2014). Los resultados indican que es importante el contacto con el forófito, ya que este es el sustrato donde se encuentran las esporas de los hongos y la presencia de musgos, líquenes, bromelias y helechos en las ramas de los encinos permite la acumulación de residuos orgánicos, que ayudan a reducir la variación térmica y a retener la humedad, condiciones que permiten el establecimiento de las orquídeas epífitas (Granados-Sánchez *et al.*, 2003).

Con respecto a *Prosthechea karwinskii*, se halló que las plantas colectadas en la comunidad de Santa Catarina Estetla, exhibieron una colonización cortical del 68 %, y los especímenes nativos de La Purísima Concepción, presentaron una colonización del 65 %. Al realizar la comparación de medias en esta especie no se encontraron diferencias significativas entre las dos zonas de colecta (Figura 4). Mientras que en *R. aptera* la ocupación del tejido cortical fue del 48 %, y al comparar los niveles de colonización entre estas especies, se observó una mayor micorrización en *P. karwinskii*, con respecto a *R. aptera* y se determinó una diferencia significativa entre ambas especies (Figura 4).

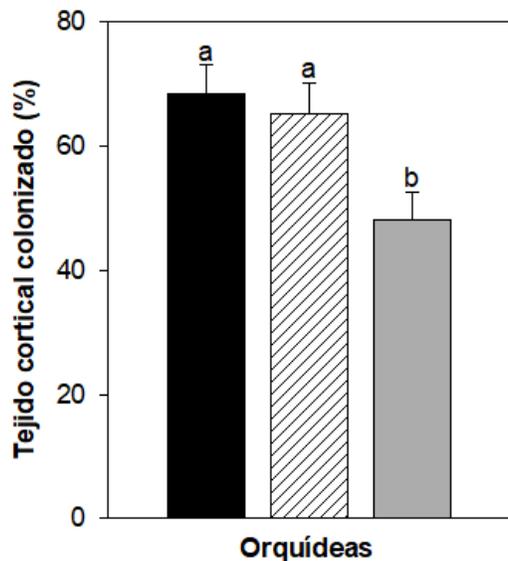


Figura 1.4. Porcentaje de colonización en el tejido cortical de *P. karwinskii* y *R. aptera*. *P. karwinskii* colectada en la comunidad de Santa Catarina Estetla = barra negra; *P. karwinskii* de la comunidad La Purísima Concepción = barra con diagonales; *R. aptera* originaria de San Esteban Atlatlahuca = barra gris. Los valores son medias \pm el error estándar, y aquellos con la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$); n = 675; Diferencia Mínima Significativa = 16.11.

En *P. karwinskii* de Santa Catarina Estetla se observaron 700 cortes transversales, y con estos datos se registró que la colonización se extendió en 99 % de las raíces analizadas, en *P. karwinskii* de La Purísima Concepción, se consideró el mismo número de cortes y se estimó una extensión en 98 % del tejido cortical que se examinó. Mientras que, en *R. aptera* se contaron 900 cortes y se apreció una extensión de 91 % en el tejido que se estudió. Esto nos indica, que los simbiontes habitan una gran área del cortex en las raíces de estas orquídeas epífitas, pero en diferentes proporciones, como lo indican los resultados obtenidos. En la Figura 5 se muestra la presencia de pelotones fúngicos o el enrollamiento de hifas, que es la característica morfológica de esta simbiosis.

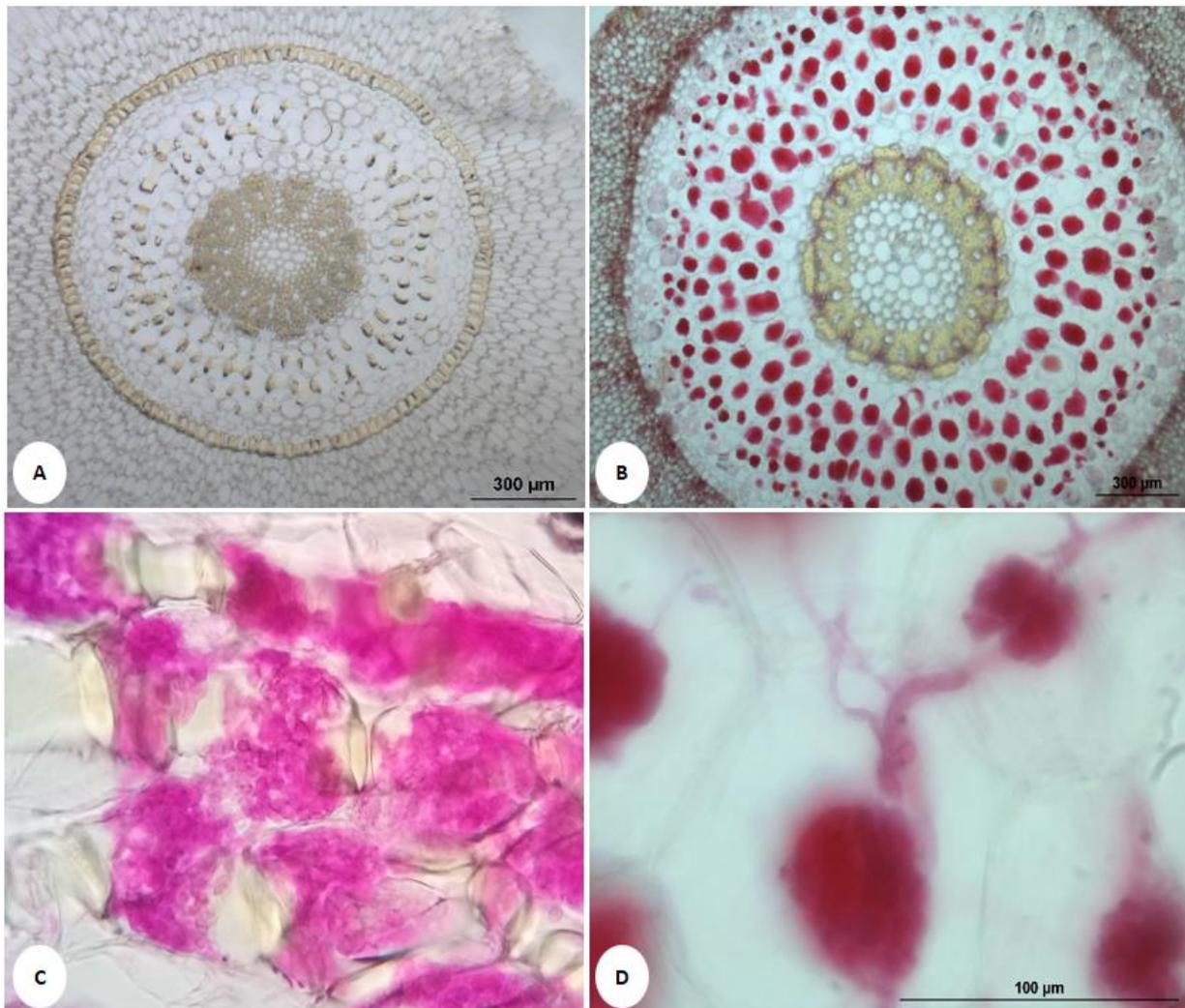


Figura 1.5. Colonización en el tejido cortical de *L. furfuracea* y *R. aptera*. A) Cortex libre de micorrización a 10x; B) 100 % de colonización a 4x; C) Pelotones no digestados a 40x; D) Pelotones digeridos e hifas fúngicas a 100x. A) y C) corresponden a *L. furfuracea*; B) y D) a *R. aptera*.

En las tres especies de estudio siempre se encontraron pelotones digestados o degradados, solo en contadas ocasiones, al rededor del 1 % se apreciaron pelotones no digestados o recién formados, y fue posible observar el enrollamiento de las hifas (Figura 5).

Con base en los resultados obtenidos y la literatura consultada, se sabe que la presencia de los simbiontes depende del hábito de crecimiento, de la especie (Sathiyadash *et al.*, 2012), del estado fenológico de las raíces (Raman y Nagarajan, 1999; Bertolini *et al.*, 2014), de la edad de la planta (Bagyaraj y Powel, 1983; Rasmussen y Whigham, 2002), del contacto con el sustrato que se deposita en la corteza del forófito (Bermudes y Benzing, 1989; Lesica y Antibus, 1990), y de la variación estacional (Hossain, 2019).

Es importante mencionar que la distribución de las orquídeas en sus forófitos, ha sido poco explorada (Halbinger y Soto, 1997). Es probable que la preferencia de *L. furfuracea*, *P. karwinskii* y *R. aptera*, por los encinos dependa de la distribución de los simbiontes, y de las propiedades físicas y químicas de la corteza del hospedero, que pueden influir en su germinación y desarrollo (Otero *et al.*, 2007; Bergstrom y Carter, 2008; Zettler *et al.*, 2011; Harshani *et al.*, 2013). Por ello, hay que desarrollar la investigación en este ámbito, para conocer más sobre esta relación.

En el caso de que se conozcan los simbiontes y las condiciones para que esta relación se lleve a cabo, se podrían desarrollar programas dirigidos a la conservación y propagación de estas especies, lo que podría llegar a ser una fuente de ingreso sostenible para los pobladores que habitan en las cercanías de las zonas de estudio, en un largo plazo.

El análisis de los datos nos indicó que *P. karwinskii* es la especie que cuenta con mayor proporción del tejido cortical colonizado por pelotones con 68 % para las plantas que crecieron en la comunidad de Santa Catarina Estetla; 65 % para la misma especie que se desarrolló en la comunidad de La Purísima Concepción; seguida de *R. aptera* con 48 %, y de *L. furfuracea* fue 38 %, cuando se realizó el análisis de las raíces completas; sin embargo, al analizar las diferentes áreas de la raíces se obtuvo que la colonización fue mayor en el área central de las raíces maduras de *L. furfuracea* con 50 %.

Las raíces de *P. karwinskii* se desarrollan entre y por debajo de la corteza, y es por esta característica, que se atribuye una mayor proporción del tejido cortical colonizado, ya que en las

raíces se conserva la humedad por más tiempo, lo que favorece el establecimiento y mantenimiento de los simbiontes, en comparación a las raíces de *L. furfuracea* que crecen y se extienden por encima de la corteza, y al estar expuestas pierden con mayor facilidad la humedad. Las especies en estudio son de importancia cultural y económica, son colectadas y comercializadas para las festividades de semana santa, día de todos santos y navidad. Sufren la presión de una extracción masiva, lo que está afectando sus comunidades naturales.

1.6 CONCLUSIONES

Se observó que el tejido cortical de *L. furfuracea*, *P. karwinski* y *R. aptera* está colonizado en diferentes grados por los hongos orquideoides. En *L. furfuracea* se encontró que la colonización varió en función a la edad de las raíces, y que la distribución de los simbiontes va a fluctuar a lo largo de las raíces, ya que la mayor micorrización se localizó en el área central de las raíces, siempre que entraran en contacto con la corteza de su hospedero, ya que la presencia de residuos orgánicos influye en la presencia de los simbiontes. De igual forma se demostró que en *P. karwinski* y *R. aptera*, la colonización del tejido cortical de las raíces está influenciado por el contacto con los residuos orgánicos que se depositan en el forófito.

1.7 LITERATURA CITADA

- Bagyaraj, D. J., & Powell, C. Ll. (1983). Occurrence and intensity of mycorrhizal infections in cultivated orchids in some New Zealand nurseries. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 26(3), 409-412.
- Bergstrom, B., & Carter, R. (2008). Host-tree Selection by an Epiphytic Orchid, *Epidendrum magnoliae* Muhl. (Green Fly Orchid), in an Inland Hardwood Hammock in Georgia. *Southeastern Naturalist*, 7(4), 571-580.
- Bermudes, D., & Benzing, D. H. (1989). Fungi in neotropical epiphyte roots. *Bio Systems*, 23(1), 65-73.
- Bertolini, V., Cruz-Blasi, J., Damon, A., & Valle, J. (2014). Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botanica Brasilica*, 28(4), 512-518.
- Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., & Sivasithamparam, K. (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research*, 111(Pt 1), 51-61.

- Bougoure, J., Ludwig, M., Brundrett, M., Cliff, J., Clode, P., Kilburn, M., & Grierson, P. (2014). High-resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco-heterotrophic orchid. *Plant, Cell and Environment*, *37*, 1223-1230.
- Cameron, D. D., Johnson, I., Leake, J. R., & Read, D. J. (2007). Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*, *99*(5), 831-834.
- Cameron, D. D., Leake, J. R., & Read, D. J. (2006). Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist*, *171*(2), 405-416.
- Cruz, J. (2007). *Colonización micorrizica y diversidad de hongos micorrizicos de algunas especies de orquídeas epífitas tropicales en el Sureste de Chiapas* (tesis de maestría). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.
- de la Rosa-Manzano, E., Andrade, J. L., Zotz, G., & Reyes-García, C. (2014). Epiphytic orchids in tropical dry forests of Yucatan, México – Species occurrence, abundance and correlations with host tree characteristics and environmental conditions. *Flora*, *209*(2), 100-109.
- Fay, M. F., & Chase, M. W. (2009). Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. Preface. *Annals of Botany*, *104*(3), 359-364.
- Fay, M. F., Pailler, T., & Dixon, K. W. (2015). Orchid conservation: making the links. *Annals of Botany*, *116*(3), 377-379.
- Granados-Sánchez, D., López-Ríos, G. F., Hernández-García, M. Á., & Sánchez-González, A. (2003). Ecología de las plantas epífitas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, *9*(2), 101-111.
- Hadley, G., & Williamson, B. (1972). Features of mycorrhizal infection in some malayan orchids. *New Phytologist*, *71*, 1111-1118.
- Halbinger, F., & Soto, M. (1997). Laelias of México. *Orquidea (Méx.)*, *15*, 1-160.
- Harshani, H. C., Senanayake, S., & Sandamali, H. (2013). Host tree specificity and seed germination of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C.E.C. Fisch. in Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, *41*(3), 71-86.
- Hossain, M. (2019). Morpho-molecular characterization of *Ceratobasidium* sp.: A mycorrhizal fungi isolated from a rare epiphytic orchid *Gastrochilus calceolaris* (J. E. Sm.) D. Don. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, *26*(2), 249-257.
- Jiménez, N. (2013). *Sustrato, soluciones nutritivas y concentración nutrimental de las orquídeas epífitas amenazadas Paphiopedilum insigne y Laelia autumnalis* (tesis doctoral). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

- Lesica, P., & Antibus, R. (1990). The Occurrence of Mycorrhizae in Vascular Epiphytes of Two Costa Rican Rain Forests. *Biotropica*, 22(3), 250-258.
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219(4), 1207-1215.
- Otero, J. T., Aragón, S., & Ackerman, J. D. (2007). Site variation in spatial aggregation and phorophyte preference in *Psychilis monensis* (Orchidaceae). *Biotropica*, 39(2), 227-231.
- Raman, N., & Nagarajan, N. (1999). Mycorrhizal association of orchids in a tropical forest of southern India. *Journal of Tropical Forest Science*, 11(3), 548-553.
- Rasmussen, H., & Whigham, D. (2002). Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist*, 154, 797-807.
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Uma, E., & Pandey, R. R. (2012). Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions*, 7(3), 238-247.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Third Edition. London: Academic Press. Chapter 12, The mycorrhizas of green orchids; p.419-457.
- Stancato, G. C., Mazzafera, P., & Buckeridge, M. S. (2001). Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 1009-1016.
- Zettler, L. W., Corey, L., Richardson, L., Ross, A., & Moller-Jacobs, L. (2011). Protocorms of an epiphytic Orchid (*Epidendrum amphistomum* A. Richard) recovered *in situ*, and subsequent identification of associated mycorrhizal fungi using molecular markers. *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2), 108-114.
- Zotz, G., & Winkler, U. (2013). Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia*, 171, 733-741.

CAPÍTULO II. BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS Y PRODUCTORAS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO ASOCIADAS CON ORQUÍDEAS EPÍFITAS

Claudia García Sánchez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

2.1 RESUMEN

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son de interés, debido a que se pueden utilizar en la producción de cultivos ornamentales, medicinales y alimenticios, y su implementación podría disminuir la aplicación de fertilizantes químicos, que degradan y contaminan los ecosistemas, y los suelos agrícolas. En las orquídeas se han identificado rizobacterias de importancia funcional capaces de promover la germinación de las semillas, y de estimular el crecimiento de las plántulas, lo cual resulta útil en la preservación de estas especies, afectadas por la deforestación de sus hábitats naturales. En el presente trabajo se aislaron y se seleccionaron bacterias solubilizadoras de fosfatos y productoras de ácido indolacético, en tres orquídeas endémicas de México: *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* y *Rhynchostele aptera*. La colecta se realizó en tres comunidades del estado de Oaxaca. Para obtener los aislamientos bacterianos se pesó 1 g de raíz, se cortaron en fragmentos de 5 mm y se lavaron. Se realizaron diluciones seriadas y a partir de la dilución 10^5 se tomó una muestra por triplicado y se procedió a la siembra en medios de cultivo específicos. Posteriormente, se seleccionaron colonias aisladas y se cultivaron por estría cruzada. Cada uno de los aislamientos se sembró en el medio Pikovskaya, y si se formó un halo traslucido alrededor de la colonia, se seleccionó, para realizar la prueba cuantitativa de solubilización de fosfatos. En el caso de las bacterias productoras de ácido indolacético (AIA) se utilizó el medio Luria-Bertani líquido, al cual se adicionó el reactivo de Salkowski. Posteriormente, se eligieron las cepas que desarrollaron una coloración rosa para efectuar la cuantificación de AIA. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza y una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). A partir de *L. furfuracea* se obtuvieron 20 aislamientos, de *P. karwinskii* de Santa Catarina Estetla 18, de *P. karwinskii* de la Purísima Concepción 29, y de *R. aptera* 11, respectivamente. De las 78 cepas de bacterias, 24 solubilizaron fosfatos en un rango de 26.31 a 14.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 15 produjeron AIA de 0.12 a 0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y solo en 4 aislamientos se detectaron ambas capacidades.

Palabras clave: Conservación, *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* y *Rhynchostele aptera*.

CHAPTER II. PHOSPHATE SOLUBILIZING AND INDOLACETIC ACID PRODUCING BACTERIA ASSOCIATED TO THREE EPIPHYTE ORCHIDS

Claudia García Sánchez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

2.2 ABSTRACT

Plant growth-promoting bacteria are of great ecophysiological relevance, because they can be used in the production of ornamental, medicinal and food crops, and their implementation could reduce the application of chemical fertilizers, which degrade and pollute ecosystems and agricultural soils. Rhizobacteria capable of promoting seed germination and stimulating seedling growth have been identified in orchids, which have great potential for the conservation of these species, strongly affected by deforestation of their natural habitats. For these reasons, in this work the isolation and characterization of bacteria capable to solubilize phosphates and produce indoleacetic acid was conducted in three endemic orchids of Mexico: *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii*, and *Rhynchostele aptera*. The sampling was carried out in the three communities in the state of Oaxaca. In order to obtain the bacterial isolates, 1 g of root was weighed, cut into 5 mm fragments and washed. Serial dilutions were made and from 10^5 dilution a sample was taken in triplicate and grow in solid agar plates containing specific culture media. Some isolated colonies were selected and cultured. Subsequently, each of the isolates was grown in Pikovskaya medium, and if a translucent halo was formed around the colonies, they were selected, to perform the quantitative phosphate solubilization test. For the isolation of bacteria able to produce indoleacetic acid (AIA), the Luria-Bertani liquid medium was used, to which Salkowski reagent was added, and the colonies that developed a pink coloration were chosen to carry out the quantification of AIA. An analysis of variance and Tukey's test ($\alpha = 0.05$) were applied to the data obtained. In *L. furfuracea*, 20 isolates were obtained, in *P. karwinskii* from Santa Catarina Estetla 18, in *P. karwinskii* from La Purísima Concepción 29, and *R. aptera* 11, respectively. Among the 78 isolates, 24 solubilized phosphates in a range of 26.31 to 14.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 15 produced IAA of 0.12 to 0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and only in 4 of the them both abilities were recorded.

Keywords: Conservation, *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* and *Rhynchostele aptera*.

2.3 INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente, es relevante el estudio de las bacterias que habitan en los tejidos de las especies vegetales, ya que estos microorganismos influyen en su crecimiento y desarrollo, mediante la producción de compuestos benéficos y por ello, se han denominado rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Tsavkelova *et al.*, 2005). Estas bacterias se localizan en la rizosfera, en el rizoplasma, en el filoplasma y en los tejidos internos de las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Teixeira da Silva *et al.*, 2015). Dentro de los grupos de bacterias de mayor importancia ecofisiológica se encuentran aquellas capaces de solubilizar fosfatos y sintetizar la fitohormona, ácido indolacético.

El fósforo es una macronutriente esencial que forma parte de las moléculas orgánicas, y las reservas de este elemento se caracterizan por su insolubilidad (Ávila-Martínez *et al.*, 2015; Restrepo-Franco *et al.*, 2015) y ante su baja disponibilidad, las plantas han desarrollado asociaciones simbióticas con bacterias solubilizadoras de fosfatos, capaces de mineralizar o solubilizar las fuentes inorgánicas y orgánicas de fósforo a ortofosfatos ($H_2 PO_4$ y HPO_3), que son las formas disponibles que pueden absorber las raíces de las plantas (Gayosso-Barragán *et al.*, 2017; Nacoon *et al.*, 2020).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos representan un componente integral dentro del ciclo del fósforo. Dentro de ellas se encuentran especies de los géneros: *Achromobacter*, *Aereobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Mesorhizobium*, *Pantotea*, *Rhizobium*, *Rhodobacter* y *Serratia* (Patiño-Torres y San Clemente-Reyes., 2014). Este grupo de bacterias facilitan el establecimiento de las plantas en suelos deficientes de fosfatos e incrementan su disponibilidad (Hernández-Leal *et al.*, 2011; Ávila-Martínez *et al.*, 2015). Adicionalmente estimulan el crecimiento de las plantas, y contribuyen a incrementar las reservas de fósforo en el suelo (Hernández-Leal *et al.*, 2011; Ávila-Martínez *et al.*, 2015). Estos microorganismos liberan ácidos orgánicos, tales como; ácido cítrico, oxálico, málico, fórmico, láctico y succínico, que contribuyen a la reducción del pH de los suelos y ayudan a solubilizar el fósforo en la rizosfera, además, pueden producir ácido indolacético (AIA) (Nacoon *et al.*, 2020).

El ácido indolacético es sintetizado por las plantas y los microorganismos; quienes son los productores más eficientes de auxinas (Tsavkelova *et al.*, 2006). Dentro de los microorganismos que producen auxinas se han identificado especies de *Pseudomonas*, que son las sintetizadoras

más activas; así como especies de *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* y *Xanthomonas* (Tsavkelova *et al.*, 2005; Tsavkelova *et al.*, 2006; Pavlova *et al.*, 2017).

Las raíces exudan diversos compuestos orgánicos, entre los cuales se encuentra el triptófano, que es convertido en AIA por las rizobacterias (Mehdipour Moghaddam *et al.*, 2012; Tsavkelova *et al.*, 2016). El AIA es la fitohormona más activa y controla los procesos fisiológicos de división, expansión y diferenciación celular en las plantas (Tsavkelova *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014). Participa en la formación de raíces, en la floración, en la fotosíntesis, en la síntesis de metabolitos, y en la resistencia a factores que causan el estrés (Tsavkelova *et al.*, 2006; Mehdipour Moghaddam *et al.*, 2012; Faria *et al.*, 2013).

Algunos autores han considerado que 80 % de las bacterias rizosféricas producen AIA (Spaepen *et al.*, 2007) y es durante la fase estacionaria de su crecimiento, cuando se produce la mayor cantidad de esta fitohormona (Tsavkelova *et al.*, 2006; Mehdipour Moghaddam *et al.*, 2012).

Las bacterias aisladas de las raíces de las orquídeas participan de manera activa en su crecimiento, por medio de la producción de la fitohormona ácido indolacético y en menor medida mediante la solubilización de fosfatos, las cuales han sido empleadas de manera efectiva en la bacterización de semillas y en la inoculación de plántulas promoviendo de manera efectiva su crecimiento y desarrollo. La investigación en esta temática se ha explorado en un número restringido de orquídeas, principalmente de hábito epífito. En México, pese a la diversidad de orquídeas los estudios en esta área son limitados. Por ello, el objetivo de este trabajo fue aislar a las bacterias presentes en las raíces de las orquídeas epífitas *L. furfuracea*, *P. karwinskii* y *R. aptera*, y posteriormente se realizaron las pruebas cualitativas y cuantitativas, para seleccionar aquellas con la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar ácido indolacético.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Aislamiento de cepas bacterianas

Las raíces de las orquídeas colectadas en campo: *L. furfuracea*, *P. karwinskii* (procedente de los dos sitios de estudio) y *R. aptera*; se seleccionaron, limpiaron y cortaron en fragmentos de 5 mm de largo con navajas Gillette®. Se utilizó 1 g de raíz con velamen de cada una de las especies mencionadas y se realizaron lavados con agua destilada estéril, las muestras se mantuvieron en

agitación durante 15 minutos a 120 rpm; este proceso se realizó por triplicado (Tsavkelova *et al.*, 2007a). Las raíces limpias se transfirieron a un frasco con agua destilada estéril y se mantuvieron en agitaron durante 24 horas a 120 rpm, a partir de esta solución se tomó una alícuota de 1 mL para efectuar las diluciones (Tsavkelova *et al.*, 2007a).

De la dilución 10^5 se tomó una alícuota de 100 μL , se transfirió a una caja de Petri y se esparció con la espátula de Drigalsky. Cada muestra se sembró por triplicado y se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Cuando se observó el crecimiento bacteriano, se contaron las colonias y se determinó el número de unidades formadoras de colonias de las raíces de *L. furfuracea*, *P. karwinskii* y *R. patera*. De las colonias bacterianas que crecieron en el medio de cultivo se seleccionaron aquellas con diferente forma y color, y se resembraron por estría cruzada en cajas de Petri. Posteriormente, se resembraron en tubos inclinados con agar nutritivo, para su conservación y posterior uso (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993; Ramírez-Gama *et al.*, 2015).

En el aislamiento de cepas bacterianas se utilizaron medios selectivos sin fuentes de nitrógeno: el medio de cultivo fuente combinada de carbono para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (Rennie, 1981) (Apéndice A), y el medio de cultivo para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, modificado (Rennie, 1981) (Apéndice B) (Hernández *et al.*, 2003).

2.4.2 Bacterias solubilizadoras de fosfatos

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo nutritivo y se mantuvieron en agitación a 120 rpm, hasta alcanzar la concentración bacteriana requerida. Se empleó como referencia la escala de McFarland, y se utilizó el tubo 1 de la escala de turbidez, el cual contiene una densidad aproximada de 3×10^8 unidades formadoras de colonias (Ramírez-Gama *et al.*, 2015). Cuando se observó la turbidez adecuada, se tomó una alícuota de 10 μL y se sembró por triplicado en el medio Pikovskaya (Apéndice C). Las bacterias se incubaron durante siete días a 28 °C. En algunos casos se observó un halo traslucido alrededor de la colonia, el cual es un indicador visual cualitativo de la capacidad para solubilizar fosfatos, y con un vernier digital se registró la medida del halo en milímetros (Gayosso-Barragán *et al.*, 2017).

Las cepas bacterianas con la capacidad de solubilizar fosfatos se cultivaron en medio líquido Pikovskaya durante siete días, posteriormente se centrifugaron a 7 000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se conservó y el concentrado bacteriano se eliminó. Posteriormente, en una

microplaca de 96 pozos se adicionaron 200 μL del sobrenadante, 100 μL de vanadato y 100 μL de molibdato, cada una de las cepas bacterianas se realizó por triplicado. Después de cinco minutos se procedió a realizar la lectura en un espectrofotómetro lector de microplacas marca BioTek® a una absorbancia de 420 nm.

Para esta reacción se preparó metavanadato de amonio ($\text{NH}_4 \text{VO}_3$) al 0.25 %, en una solución de ácido nítrico (HNO_3) al 35 %, y una solución de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6 \text{MO}_7 \text{O}_{24}$) al 5 %, al adicionar estas soluciones las cepas bacterianas se tornaron color amarillo, lo que indica la presencia de fosfatos (Alcántar y Sandoval, 1999). Para la cuantificación de fosfatos se realizó una curva estándar, a partir de una solución madre de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) (Anexo 1).

2.4.3 Bacterias productoras de ácido indolacético

Todas las cepas bacterianas aisladas se sembraron por triplicado en microplacas de 96 pozos, en el medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB) modificado (Apéndice D) (Bric *et al.*, 1991). Estas cepas se incubaron a 28 °C por 48 horas. Posteriormente, en cada uno de los pozos se adicionó 150 μL del reactivo de Salkowski (se adicionaron 2 mL FeCl_3 al 0.5 M, en 100 mL de HClO_4), y se incubaron en la oscuridad por 30 minutos. Las cepas de bacterias con la capacidad de sintetizar AIA desarrollaron una coloración rosa, en diversas tonalidades (Gordon y Geber, 1951). En este caso se dio un valor de acuerdo a la intensidad observada: 0 = no desarrolló una coloración rosa, 1 = rosa pálido, 2 = rosa intermedio y 3 = fucsia. Esta escala visual solo se utilizó para la selección de cepas bacterianas con la capacidad de sintetizar AIA.

Las cepas de bacterias que sintetizaron AIA se sembraron en medio líquido LB y se mantuvieron en agitación a 120 rpm durante 48 horas, transcurrido el tiempo requerido, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 5 000 rpm, se eliminó el concentrado bacteriano y se conservó el sobrenadante. Posteriormente, en una microplaca de 96 pozos se colocaron 100 μL del sobrenadante y se adicionaron 200 μL del reactivo de Salkowski y después de 30 minutos en la oscuridad, las muestras se leyeron a 530 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas marca BioTek® (Tsavkelova *et al.*, 2005; Tsavkelova *et al.*, 2007a).

Para la cuantificación de ácido indolacético se realizó una curva estándar, a partir de una solución madre de AIA en etanol, a partir de la cual se realizaron una serie de diluciones en agua destilada (Anexo 2) (Bric *et al.*, 1991; Tsavkelova *et al.*, 2007).

2.4.4 Análisis estadístico

En cada uno de los parámetros de estudio; unidades formadoras de colonias, cuantificación de la solubilización de fosfatos y cuantificación de la síntesis de ácido indolacético, se aplicó un análisis de varianza y una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), en el programa estadístico SAS® versión 9.0.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el aislamiento de las cepas de bacterias provenientes de las raíces de las orquídeas evaluadas, se utilizaron dos medios selectivos libres de fuentes de nitrógeno: el medio de cultivo fuente combinada de carbono para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (R1), y el medio de cultivo para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre modificado (R0), debido a las características de estos medios, es probable que las colonias bacterianas que crecieron en estos medio sean fijadoras de nitrógeno. En cada uno de los casos se contabilizó el número de colonias de bacterias que crecieron aisladas en el medio de cultivo y con estos datos se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC/g de raíz). En *R. aptera* se registró el mayor número de UFC/g de raíz en el medio R1 con 2.69×10^8 , seguida de *L. furfuracea* y *P. karwinskii* de la comunidad de Santa Catarina Estetla, Oax., sin diferir significativamente. En contraste, el menor número de UFC/g de raíz se encontró en *P. karwinskii* originaria de la comunidad La Purísima Concepción, Oax., en el medio R0 con 2.40×10^7 . En el medio de cultivo R1 se registró el mayor número de colonias bacterianas en comparación al medio R0, en cada uno de los casos (Cuadro 1).

Cuadro 2.1. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en las orquídeas epífitas de estudio.

Especie de orquídea	Medio de cultivo empleado	Número de colonias bacterianas	UFC/g de raíz [♦]
<i>L. furfuracea</i>	R1	234	2.34×10^8 a
	R0	163	1.63×10^8 ab
<i>P. karwinskii</i> [‡]	R1	232	2.32×10^8 a
	R0	168	1.68×10^8 ab
<i>P. karwinskii</i> ^{‡‡}	R1	46	4.60×10^7 bc
	R0	24	2.40×10^7 c
<i>R. aptera</i>	R1	269	2.69×10^8 a
	R0	193	1.93×10^8 a

[‡] = Plantas originarias de Santa Catarina Estetla; ^{‡‡} = Plantas colectadas en La Purísima Concepción; R1 = medio de cultivo fuente combinada de carbono para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre; R0 = medio de cultivo para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, modificado; UFC/g = unidades formadoras de colonias/gramo de raíz; [♦] = Medias con la misma letra no difieren estadísticamente con la prueba Tukey ($\alpha = 0.05$); n = 3; Diferencia Mínima Significativa = 137.

A partir de las orquídeas en estudio se obtuvieron 78 aislamientos bacterianos; 45 se aislaron a partir del medio de cultivo R1 y 33 del medio de cultivo R0. En *L. furfuracea* procedente de Santa Catarina Estetla, se obtuvieron 20 aislamientos bacterianos; 12 crecieron en el medio de cultivo R1 y 8 en el medio R0. En *P. karwinskii* procedente de Santa Catarina Estetla, se logró el aislamiento de 18 cepas bacterianas; 11 se desarrollaron en el medio R1, y 7 en el medio R0. En *P. karwinskii* originaria de La Purísima Concepción, se lograron obtener 29 aislamientos bacterianos; 17 provienen del medio R1 y 12 del medio R0. Con respecto a *R. aptera* nativa de San Esteban Atatlahuca, se aislaron 11 cepas bacterianas; 5 proceden del medio de cultivo R1, y 6 del medio R0.

Los aislamientos bacterianos se nombraron con la siguiente nomenclatura: *Laelia furfuracea* de Santa Catarina Estetla (L.f.), *Prosthechea karwinskii* de Santa Catarina Estetla (P.w.), *Prosthechea karwinskii* de La Purísima Concepción (P.k.), y *Rhynchostele aptera* de San Esteban Atatlahuca (R.a.), y en cada uno de los casos, se colocó enseguida el número de aislamiento (Cuadro 2).

En las cepas de bacterias solubilizadoras de fosfatos se apreció la formación de un halo traslucido alrededor de la colonia como un indicador visual cualitativo. En *L. furfuracea* se encontraron 8 aislamientos bacterianos con esta capacidad; en L.f.6 se apreció el halo de mayor tamaño con 2.07 mm, y en L.f.15 el de menor diámetro con 0.51 mm. En *P. karwinskii* de Santa Catarina Estetla, se registraron 6 aislamientos; en P.w.6 (1.38 mm) y en P.w.17 (0.94 mm) se obtuvieron los halos de mayor y menor diámetro. En *P. karwinskii* de La Purísima Concepción, se encontraron 7 aislamientos; el halo de mayor tamaño fue de 2.54 mm en P.k.21 y el menor diámetro fue de 0.76 mm en P.k.27. Y en *R. aptera* se identificaron 3 aislamientos; en R.a.3 (1.08 mm) y en R.a.9 (0.80 mm), que corresponden al mayor y al menor valor.

Al comparar todos los aislamientos obtenidos de las orquídeas en estudio se registró que el halo de mayor diámetro fue de 2.54 mm y se observó en el aislamiento P.k.21, y el halo de menor diámetro fue de 0.51 mm en el aislamiento L.f.15. Solo en tres aislamientos bacterianos se observaron halos mayores a 2 mm de diámetro, en 16 aislamientos halos de 1.68 a 1.00 mm y en 7 aislamientos halos de 0.94 a 0.51 mm de diámetro (Cuadro 2).

Con respecto a la prueba cuantitativa se obtuvieron los siguientes resultados; en *L. furfuracea* la mayor concentración de fosfatos solubilizados fue de 26.31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en L.f.11 y la menor

concentración fue de 14.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en L.f.16. En *P. karwinskii* de Santa Catarina Estetla, se encontró el valor de 47.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en P.w.5 y de 20.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en P.w.18; en *P. karwinskii* de La Purísima Concepción, en P.k.2 con 30.24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y en P.k.8 con 19.41 $\mu\text{g mL}^{-1}$, corresponden al mayor y al menor valor respectivamente; y en *R. aptera* el mejor resultado se apreció en R.a.11 con 30.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y el menor fue de 22.47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en R.a.3.

Al realizar el análisis estadístico de los datos se apreció que el aislamiento con la mayor capacidad para solubilizar fosfatos corresponde a P.w.5 con 47.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*P. karwinskii* de Santa Catarina Estetla y el menor en L.f.16 con 14.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*L. furfuracea*) (Cuadro 2).

Con respecto a la capacidad de sintetizar ácido indolacético (AIA), las colonias bacterianas se seleccionaron a partir de una prueba cualitativa. En las muestras se apreciaron diferentes tonalidades de color rosado; rosa pálido (1), rosa intermedio (2), y fucsia (3), estas categorías de color se asignaron con la finalidad de seleccionar las bacterias productoras de AIA, con lo cual, se identificaron 3 aislamientos bacterianos en *L. furfuracea*, 2 en *P. karwinskii* de Santa Catarina Estetla, 7 en *P. karwinskii* de La Purísima Concepción y 3 en *R. aptera*, y a partir de estos aislamientos se realizaron las pruebas cuantitativas de AIA.

En *L. furfuracea* la mayor producción de AIA fue de 0.32 mg mL^{-1} en el aislamiento L.f.4 y la menor producción de AIA fue de 0.17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en L.f.17; en *P. karwinskii* de Santa Catarina Estetla, fue de 0.14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en P.w.9 y de 0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en P.w.14; en *P. karwinskii* de La Purísima Concepción, fue de 0.29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en P.k.23 y de 0.13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en P.k.18; y en *R. aptera* fue de 0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en R.a.11 y de 0.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en R.a.10, los datos corresponden a la mayor y a la menor síntesis de la fitohormona en cada una de las orquídeas en estudio.

Con respecto a la síntesis de AIA, la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) indicó que el mejor resultado se obtuvo en el aislamiento R.a.11 con 0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que corresponde a *R. aptera* y el menor en el aislamiento P.w.14 con 0.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, en *P. karwinskii* de Santa Catarina Estetla (Cuadro 2). Además, es importante mencionar que se identificaron 4 aislamientos bacterianos con la capacidad de solubilizar fosfatos y sintetizar AIA, estos se obtuvieron a partir de *P. karwinskii* de La Purísima Concepción (P.k.3, P.k.12 y P.k.23) y de *R. aptera* (R.a.11).

Cuadro 2.2. Bacterias solubilizadoras de fosfatos y productoras de ácido indolacético (AIA).

Especie de orquídea/ Procedencia	Aislamiento bacteriano	Medio de cultivo	Solubilización de fosfatos		Síntesis de AIA	
			Halo (mm)	($\mu\text{g mL}^{-1}$) [*]	E. V.	($\mu\text{g mL}^{-1}$) [*]
<i>Laelia</i>	L.f.3	R1	0.88	20.58 ijkl	0	0.0
<i>furfuracea</i>	L.f.4	R1	0.0	0.0	2	0.32 b
Santa Catarina	L.f.6	R1	2.07	21.63 ghijk	0	0.0
Estetla	L.f.7	R1	1.20	17.51 mn	0	0.0
	L.f.8	R1	1.00	16.85 no	0	0.0
	L.f.9	R1	0.88	16.73 no	0	0.0
	L.f.10	R1	1.36	21.42 hijkl	0	0.0
	L.f.11	R1	1.06	26.31 cd	0	0.0
	L.f.12	R1	1.44	24.73 def	0	0.0
	L.f.15	R0	0.51	18.91 lmn	0	0.0
	L.f.16	R0	1.46	14.58 o	0	0.0
	L.f.17	R0	0.0	0.0	2	0.17 fg
	L.f.19	R0	0.0	0.0	3	0.24 cd
<i>Prosthechea</i>	P.w.5	R1	1.00	47.18 a	0	0.0
<i>karwinskii</i>	P.w.6	R1	1.38	20.80 ijkl	0	0.0
Santa Catarina	P.w.7	R1	1.05	21.23 ijkl	0	0.0
Estetla	P.w.9	R1	0.0	0.0	3	0.14 hi
	P.w.14	R0	0.0	0.0	3	0.12 j
	P.w.15	R0	1.37	24.24 defg	0	0.0
	P.w.17	R0	0.94	22.63 fghij	0	0.0
	P.w.18	R0	1.51	20.75 ijkl	0	0.0
<i>Prosthechea</i>	P.k.3	R1	1.68	22.82 efghi	1	0.17 fg
<i>karwinskii</i>	P.k.7	R1	0.0	0.0	1	0.16 gh
La Purísima	P.k.8	R1	2.13	19.41 klmn	0	0.0
Concepción	P.k.10	R1	0.0	0.0	1	0.14 hi
	P.k.12	R1	0.92	25.43 cde	1	0.26 c
	P.k.17	R1	0.0	0.0	2	0.19 ef
	P.k.18	R0	0.0	0.0	1	0.13 ij
	P.k.21	R0	2.54	20.00 jklm	0	0.0
	P.k.23	R0	1.31	24.06 defgh	1	0.29 e
	P.k.27	R0	0.76	30.24 b	0	0.0
	P.k.29	R0	1.12	29.45 b	0	0.0
<i>Rhynchostele</i>	R.a.2	R1	0.0	0.0	2	0.23 d
<i>aptera</i>	R.a.3	R1	1.08	22.47 fghij	0	0.0
San Esteban	R.a.9	R0	0.80	28.12 bc	0	0.0
Atatlahuca	R.a.10	R0	0.0	0.0	2	0.22 d
	R.a.11	R0	1.04	30.76 b	3	0.40 a
Media				23.42		0.21
DMS				2.70		0.02

R1 = medio de cultivo fuente combinada de carbono para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre; R0 = medio para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, modificado; E.V. = Escala visual: 0 = no desarrolló una coloración rosa; 1 = rosa pálido; 2 = rosa intermedio; 3 = fucsia; ^{*} = Medias con la misma letra no difieren estadísticamente con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$); n = 3; DMS = Diferencia Mínima Significativa.

En este estudio se registraron 78 aislamientos bacterianos, 26 mostraron la capacidad de solubilizar fosfatos y 15 sintetizaron ácido indolacético (AIA), de los cuales, solo 4 se caracterizaron por desempeñar ambas funciones. Mientras que, en los 41 aislamientos restantes, no se registró ninguna de las actividades que se evaluaron (Figura 6).

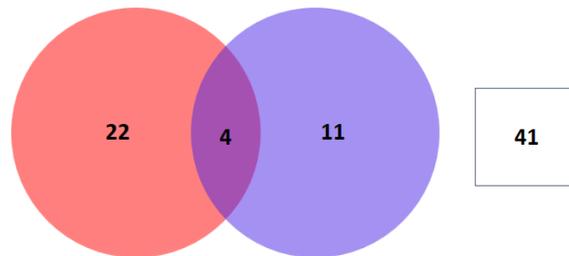


Figura 2.6. Diagrama de Venn que muestra las cepas de bacterias con la capacidad de solubilizar fosfatos (color rojo), bacterias que sintetizaron el ácido indolacético (color azul), y aislamientos que comparten ambas capacidades (color violeta) en las orquídeas epífitas evaluadas.

Los estudios que reportan la presencia de bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB) en otras orquídeas son pocos y entre ellos se encuentra *Guarianthe skinneri* en donde se identificó a *Bacillus* sp. y registraron halos de solubilización de 2.31 mm a 3.48 mm (Aguilar-Díaz *et al.*, 2018). En las orquídeas terrestres *Spiranthes spiralis*, *Serapias vomeracea* y *Neottia ovata* se han registrado halos de 2.17 mm con *Pantoea* sp. y de 4.50 mm con *Pseudomonas* sp. (Alibrandi *et al.*, 2020). Mientras tanto en *Cymbidium eburneum* dos aislamientos de *Paenibacillus* sp. produjeron AIA, pero no solubiliaron fosfatos (Faria *et al.*, 2013).

En cambio, en otras especies vegetales los estudios han sido más amplios, por ejemplo, a partir de la rizosfera de *Brassica campestris* spp. *chinensis* se obtuvo a *Bacillus cereus* que formó halos de solubilización de 0.4 mm y solubilizó de 10.1 a 13.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Wang *et al.*, 2017). En suelos productores de soya se aisló a *Bradyrhizobium* sp., y se observaron halos de 4 a 15 mm y solubiliaron de 206 a 241 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fernández *et al.*, 2005). En la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), se registraron halos de 1.04 a 2.10 mm y una solubilización de 327 a 520 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con *Sphingobacterium thalpophilum* y *Pseudomonas aeruginosa* (Nacoon *et al.*, 2020). En la caña de azúcar el aislamiento de *Pantoea* sp. formó halos de 6 mm de solubilización y se registró una concentración de 1 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Cordero *et al.*, 2008). Mientras tanto en PSB obtenidas del cultivo de *Oryza sativa*, se registraron halos de 2.25 a 3.07 mm con la capacidad de solubilizar de 15.8 hasta 239 mg L^{-1} (Estrada *et al.*, 2013).

En el presente estudio se encontraron bacterias con la capacidad de solubilizar fosfatos a partir del fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, que representa una fuente difícil de degradar, como se ha demostrado en otros trabajos (Cordero *et al.*, 2008; Estrada *et al.*, 2013).

Las investigaciones sobre la composición de nutrientes en los suelos de los troncos y del dosel indican que son ricos en nutrientes, y destacan los altos niveles de fosfatos, pero la naturaleza ácida del estrato arbóreo impide que estos elementos estén disponibles para las orquídeas epífitas (Lesica y Antibus, 1990).

El fósforo (P) es un elemento primordial en el crecimiento y el desarrollo de las plantas; pero después del nitrógeno, es el segundo elemento más limitante en el crecimiento de las plantas dentro de los ecosistemas naturales y en los sistemas con manejo antrópico (Ávila-Martínez *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Los iones fosfato presentes en el suelo se unen fácilmente con otros elementos y se forman complejos poco solubles como el fosfato de hierro (FePO_4), el fosfato de aluminio (AlPO_4), y el fosfato de calcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, lo que provoca su precipitación y su baja concentración en el suelo, entre 5 y 30 mg Kg^{-1} (Fernández *et al.*, 2005; Hernández-Leal *et al.*, 2011).

Sin embargo, las bacterias y hongos que se asocian a las raíces de diversas especies vegetales son capaces de solubilizar este elemento, mediante diferentes mecanismos (Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014), y en la mayoría de las bacterias solubilizadoras de fosfatos, como se mencionó anteriormente, se ha demostrado su capacidad para producir ácidos orgánicos: cítrico, láctico acético, tartárico, glucónico y oxálico (Wang *et al.*, 2017; Nacoon *et al.*, 2020).

Estos ácidos orgánicos poseen grupos hidroxilo (OH) y carboxilo (COOH) que quelan a los cationes ligados a los fosfatos, y de este modo liberan los iones ortofosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ y HPO_3^{-2}), los cuales son absorbidos por las plantas (Ávila-Martínez *et al.*, 2015).

Para lograr altos rendimientos en los cultivos se requiere la aplicación de fertilizantes fosfatados, sin embargo, se estima que la reserva mundial de este mineral se agotará en 50 % durante el periodo de 2040 a 2060 (Cordero *et al.*, 2008). Por ello, las bacterias solubilizadoras de fosfatos de Ca, Fe, y Al poseen una enorme importancia y son vitales en el ciclo del fósforo dado que pueden ser empleadas para incrementar la disponibilidad de este elemento (Hernández-Leal *et al.*, 2011; Ávila-Martínez *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que la inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, y la co-inoculación con hongos micorrícicos arbusculares son benéficos e incrementan la absorción de fósforo, lo que origina un mejor crecimiento, establecimiento y rendimiento de los cultivos, por ello, son una excelente opción para disminuir la aplicación de fertilizantes químicos (Cordero *et al.*, 2008; Ávila-Martínez *et al.*, 2015; Nacocon *et al.*, 2020).

En cuanto al número y tipo de microorganismos solubilizadores de fosfatos asociados a las raíces de las especies vegetales, este dependerá de las fuentes de carbono y de los demás nutrientes disponibles en la rizosfera y el rizoplano; así como del clima, el tipo de suelo, y la historia de cultivo del suelo (Fernández *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2013).

Los estudios se han centrado en el aislamiento e identificación de estas bacterias, sin embargo, falta mucho conocimiento relacionado con la colonización de las PSB en la rizosfera y los mecanismos implicados en la disolución del fósforo (Wang *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que las bacterias aisladas de los tejidos de las orquídeas, sintetizan de manera natural fitohormonas, entre ellas destaca y ha sido la más estudiada el ácido indolacético. En *Calanthe vestita* se encontraron rangos de síntesis de 1.18 a 6.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA; en *Dendrobium moschatum* de 0.50 a 92.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$; en *Acampe papillosa* de 0.70 a 69.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las bacterias involucradas en este proceso fueron identificadas como *Xanthomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Rhodococcus* y *Microbacterium* sp. (Tsavkelova *et al.*, 2005; Tsavkelova *et al.*, 2007). En *Paphiopedilum appletonianum*, la bacteria *Burkholderia* sp., sintetizó 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y *Bacillus* sp. 55.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En *Pholidota articulata* con *Burkholderia* sp. se observó una solubilización de 6.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y con *Bacillus* sp. fue de 58.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tsavkelova *et al.*, 2007a).

En *Cattleya walkeriana*, *Pantotea* sp., sintetizó 1.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y *Enterobacter* sp. 32.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (Galdiano Junior *et al.*, 2011). En *Cymbidium eburneum*, *Paenibacillus lentimorbus* promovió la formación de 1.50 a 3.63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Faria *et al.*, 2013). En *Dendrobium officinale* se registró un valor de 11.75 ng mL^{-1} , con *Sphingomonas paucimobilis* (Yang *et al.*, 2014). En *Dendrobium moschatum* con *Sphingomonas* sp. fue de 29.4 a 52.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, en *Enterobacter* sp. fue de 59.4 a 71.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y en *Roseomonas* sp. de 0.8 a 20.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (Tsavkelova *et al.*, 2016).

En *Dendrobium nobile* con *Klebsiella oxytoca* se registraron 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (Pavlova *et al.*, 2017). En *Guarianthe skinneri* con *Bacillus* sp. 10.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y en *Sinorhizobium* sp. 69.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Aguilar-Díaz *et al.*, 2018). Y en tres orquídeas terrestres (*Spiranthes spiralis*, *Serapias vomeracea* y *Neottia ovata*) se localizaron bacterias del género *Pseudomonas* (43.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) *Pantoea* (0.86 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Rahnella* (108.47 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Bacillus* (3.23 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *Microbacterium* (14.29 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y *Fictibacillus* (33.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Alibrandi *et al.*, 2020). En todos los estudios se registró que la adición de triptófano al medio de cultivo incrementó la síntesis de AIA.

En las orquídeas, los trabajos realizados se han enfocado al aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, mediante la síntesis de auxinas (Wilkinson *et al.*, 1989), y en la identificación, con la ayuda de herramientas moleculares (Yu *et al.*, 2013) y metagenómicas (Pei *et al.*, 2017). Con estas herramientas se ha identificado que la abundancia bacteriana asociada con las orquídeas se encuentra influenciada por: la variación estacional y el diámetro de la raíz de la especie de la orquídea (Wilkinson *et al.*, 1989); el estado fisiológico de la planta y; del hábito de crecimiento (terrestres o epífitas) (Wilkinson *et al.*, 1994). Adicionalmente, se ha registrado que la diversidad bacteriana es mayor en las raíces aéreas, en comparación a las que crecen en contacto con el sustrato (Tsavkelova *et al.*, 2004). En resumen, la morfología y la fisiología de estas plantas influye en la composición bacteriana, en parte determinada por el ambiente y las características del nicho ecológico en donde se desarrollan (Wilkinson *et al.*, 1994a; Tsavkelova *et al.*, 2001; Tsavkelova *et al.*, 2004).

Las bacterias que se han aislado de las orquídeas se han utilizado en la inoculación de semillas *in vitro* (Wilkinson *et al.*, 1994a; Pavlova *et al.*, 2017), en la aclimatación *ex vitro* de plántulas de *Cattleya walkeriana* y *Catleya loddigesii* (Galdiano Junior *et al.*, 2011; Faria *et al.*, 2013), en cuyos casos se ha promovido la germinación, el crecimiento y desarrollo. También se ha demostrado la efectividad de la rizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* en el control de hongos patógenos (White *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha comprobado que la co-inoculación de rizobacterias con los hongos micorrícicos arbusculares promueve en mayor medida el desarrollo de la parte aérea y del sistema radical en las plántulas de *Vanilla planifolia* y de *Dendrobium catenatum* (Madhaiyan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2016).

Esto se debe a que estas bacterias participan en la producción de AIA, que es la auxina más activa en la división, expansión y diferenciación de las células y de los tejidos (Tsavkelova *et al.*, 2016),

por ello, representan una alternativa biotecnológica en la conservación de estas especies que sufren la depredación de los diferentes ecosistemas en donde se desarrollan (Tsavkelova *et al.*, 2007a).

2.6 CONCLUSIONES

Se aislaron cepas de bacterias solubilizadoras de fosfatos y productoras de ácido indolacético, a partir de las raíces de las especies de orquídeas epífitas nativas de México *L. furfuracea*, *P. karwinskii* y *R. aptera*. Este representa un hallazgo importante, ya que la familia Orquidaceae es la más diversa entre las plantas, y pese a ello, el estudio de las rizobacterias ha sido poco explorado y comprendido, en comparación con otras familias vegetales, en donde se ha generado mayor información. Conocer a estos microorganismos nos da la oportunidad de poder utilizarlos en otras orquídeas o en otros cultivos de interés, para la preservación y conservación del ambiente, ya que la aplicación excesiva de fertilizantes químicos ha causado daños a los recursos naturales, esenciales para el desarrollo de la vida.

2.7 LITERATURA CITADA

- Aguilar-Díaz, T., Bertolini, V., Carillo, G., Guillén, G. K. García, L. V. & Castro R. A. (2018). Rizobacterias promotoras de crecimiento en *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 66(3), 953-968.
- Alcántar, G., & Sandoval, M. (1999). *Manual de Análisis químicos de tejido vegetal: Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación*. México: Sociedad Mexicana del Suelo, A. C. UACH.
- Alibrandi, P., Monaco, N., Calevo, J., Voyron, S., Puglia, A. M., Cardinale, M., & Perotto, S. (2020). Plant growth potential of bacteria endophytes from three terrestrial mediterranean orchid species. *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-12.
- Ávila-Martínez, E. G., Lizarazo-Forero, L. M., & Cortés-Pérez, F. (2015). Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizosfera. *Acta biológica colombiana*, 20(3), 121-131.
- Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay indoleacetic acid Production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 535-538.
- Cordero, J., Ortega-Rodés, P., & Ortega, E. (2008). La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 111-121.
- Estrada, G. A., Baldani, V. L. D., de Oliveira, D. M., Urquiaga, S., & Baldani, J. I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil*, 369, 115-129.
- Faria, D. C., Dias, A. C. F., Melo, I. S., & de Carvalho, F. E. (2013). Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 217-221.
- Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A., & Sagardoy, M. A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 23(1), 31-37.
- Ferrera-Cerrato, R., González, M. del C. Á., & Rodríguez, M. de las N. (1993). *Manual de agromicrobiología*. México: Trillas.
- Galdiano Júnior, R., Pedrinho, E., Castellane, T. C., & Lemos, E. (2011). Bactérias produtoras de auxinas isoladas de raízes de *Cattleya walkeriana*, orquídea Brasileira ameaçada de extinção, e sua função na aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35(3), 729-737.

- Gayosso-Barragán, O., Rodríguez-Herrera, S. A., López-Benítez, A., & Luevanos-Escareño. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos y su potencial para disolver fosfato tricalcico. *Revista de Investigación y Desarrollo*, 3(7), 33-37.
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26, 192-195.
- Hernández, A. E., Ferrera-Cerrato, R., & Rodríguez, V. R. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra Latinoamericana*, 21(1), 81-89.
- Hernández-Leal, T. I., Carrión, G., & Heredia, G. (2011). Solubilización *in vitro* de Fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 45, 881-892.
- Lesica, P., & Antibus, R. (1990). The Occurrence of Mycorrhizae in Vascular Epiphytes of Two Costa Rican Rain Forests. *Biotropica*, 22(3), 250-258.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Madhaiyan, M., Santhanakrishnan, P., & Prgatheswari, D. (2002). Combined inoculation of orchid mycorrhizal fungi and phosphobacteria on the growth of *Vanilla planifolia* and R. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 4(4), 429-433.
- Mehdipour Moghaddam, M. J., Emtiazi, G., & Salehi, Z. (2012). Enhanced auxin production by *Azospirillum* pure cultures from plant root exudates. *Journal of Agricultural and Technology*, 14(5), 985-994.
- Nacoon, S., Jogloy, S., Riddech, N., Mongkolthananuk, Kuyper, T., & Boonlue, S. (2020). Interaction between phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on growth promotion and tuber inulin content of *Helianthus tuberosus* L. *Scientific Reports*, 10, 1-10.
- Patiño-Torres, C. O., & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2), 288-2897.
- Pavlova, A. S., Leontieva, M. R., Smirnova, T. A., Kolomeitseva, G. L., Netrusov, A. I., & Tsavkelova, E. A. (2017). Colonization strategy of the endophytic plant growth promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl. *Journal Applied Microbiology*, 123, 217-232.
- Pei, C., Mi, C., Sun, L., Liu, W., Li, O., & Hu, X. (2017). Diversity of endophytic bacteria of *Dendrobium officinale* based on culture-dependent and culture independent methods. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(1), 112-119.

- Ramírez-Gama, R. M., Urzúa, M. C., Camacho, A., Tsuzuki, G., & Esquivel-Cote, R. (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento*. México: Trillas.
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucía-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 48(1), 63-76.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 425-448.
- Teixeira da Silva, J. A., Tsavkelova, E. A., Zeng, S., Bun, T., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Rao, M. V. (2015). Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242, 1-22.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2004). Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiology*, 73, 2710-715.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2005). Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*, 74, 46-53.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., & Netrusov, A. I. (2007a). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 162, 69-76.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Klimova, S. Y., Shestakov, A. I., Botina, S. G., & Netrusov, A. I. (2007). Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology*, 188, 655-664.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Lobakova, E. S., Kolomeitseva, G. L., & Netrusov, A. I. (2001). Microbiota of the orchid rhizoplane. *Microbiology*, 70, 492-497.
- Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Leontieva, M. R., Malakho, S. G., Kolomeitseva, G. K., & Netrusov, A. I. (2016). *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria. *Plant Growth Regulation*, 80, 79-91.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, Y. S., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical Use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126.
- Wang, X., Yam, T. W., Meng, Q., Zhu, J., Zhang, P., Wu, H., Wang, J., Zhao, Y., & Song, X. (2016). The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under in vitro culture conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 126, 523-531.

- Wang, Z., Xu, G., Ma, P., Lin, Y., Yang, X., & Cao, C. (2017). Isolation and Characterization of a Phosphorus-Solubilizing Bacterium from Rhizosphere Soils and Its Colonization of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* spp. *Chinensis*). *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1-12.
- White, J., Torres, M., Sullivan, R., Jabbour, R., Chen, Q., Tadych, M., Irizarry, I., Bergen, M., Havkin-Frenkel, D., & Belanger, F. (2014). Occurrence of *Bacillus amyloliquefaciens* as a systemic endophyte of vanilla orchids. *Microscopy Research and Technique*, *77*, 874-885.
- Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (1989). Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytologist*, *112*, 429-435.
- Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K., & Ghisalbert, E. L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and Soil*, *159*, 291-295.
- Wilkinson, K. G., Sivasithamparam, K., Dixon, K. W., Fahy, P. C., & Bradley, J. K. (1994a). Identification and characterization of bacteria associated with western Australian orchids. *Soil Biology and Biochemistry*, *26*, 137-142.
- Yang, S., Zhang, X., Cao, Z., Zhao, K., Wang, S., Chen, M., & Hu, X. (2014). Growth-promoting *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation. *Microbial biotechnology*, *7*(6), 611-620.
- Yu, J., Zhou, X.-F., Yang, S.-J., Liu, W.-H., & Hu, X.-F. (2013). Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE. *Applied Microbiology Biotechnology*, *97*, 9825-9836.

CONCLUSIONES GENERALES

En las orquídeas epífitas de estudio: *Laelia furfuracea*, *Prosthechea karwinskii* y *Rhynchostele aptera* se registró la presencia de hongos formadores de la micorriza orquideoide. Así mismo, se demostró que el estado fenológico de las raíces influye en el grado de colonización y que los simbiontes fúngicos, no se distribuyen de manera homogénea a lo largo de las raíces, ya que su distribución fluctuó de manera significativa en cada una de las áreas evaluadas en las raíces de *L. furfuracea*.

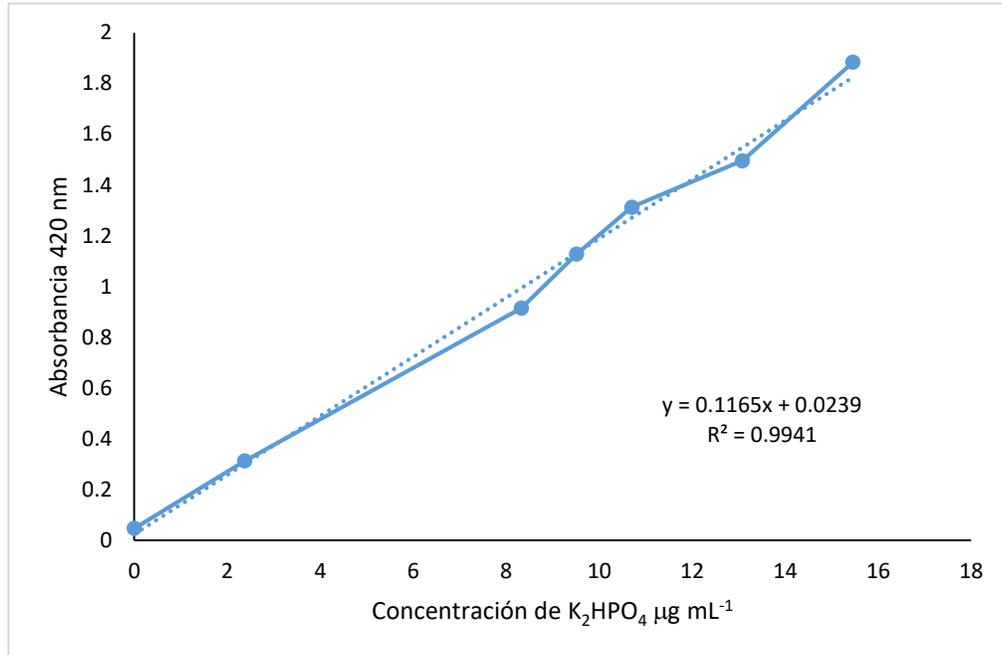
En las raíces de las orquídeas epífitas en estudio se aislaron cepas bacterianas con la capacidad de solubilizar fosfatos y de sintetizar ácido indolacético, de este modo, promueven el crecimiento vegetal en las orquídeas epífitas. Hubo aislamientos que no presentaron ninguna de estas dos actividades, pero probablemente sean capaces de realizar alguna otra función ecológica que influya en el establecimiento de las orquídeas.

Los hongos orquideoides y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se pueden emplear como una herramienta biotecnológica, en la conservación de especies que están en peligro de extinción, y hoy en día, comienzan a ser aprovechados para la inoculación de semillas y plántulas, con la finalidad de promover el establecimiento exitoso de estas especies.

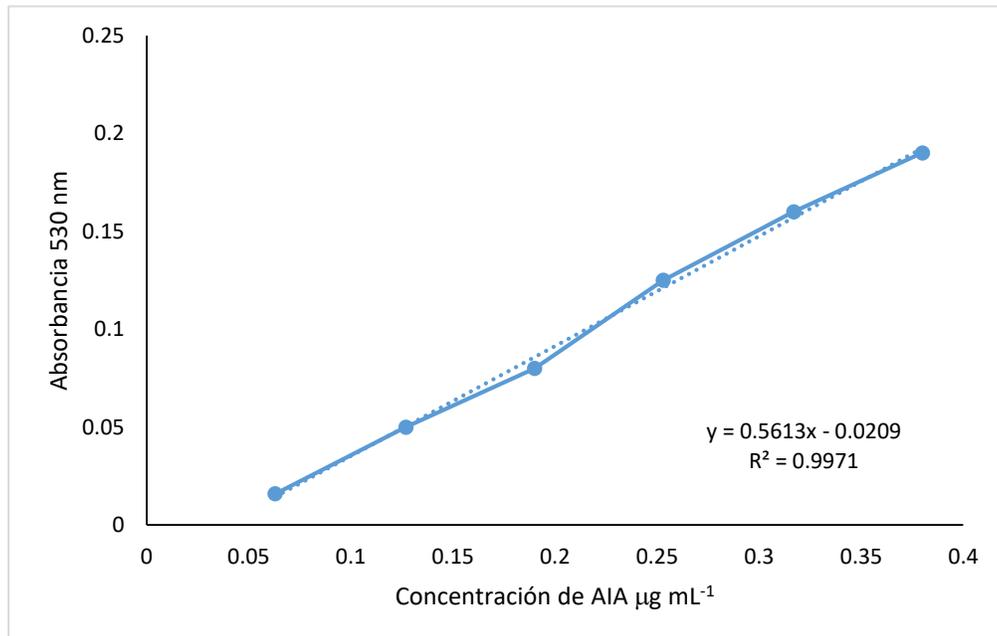
México cuenta con una diversidad importante de orquídeas, muchas de las cuales son endémicas y se conoce poco sobre la interacción que establecen con los hongos orquideoides y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, por ello, esta investigación representa un aporte importante en esta área del conocimiento, de las cual queda mucho por descubrir.

Finalmente, los forófitos de las orquídeas epífitas, son indispensables en el establecimiento de estas especies vegetales, ya que la arquitectura de las ramas, la rugosidad de la corteza, y la retención de humedad, son algunos de los factores que pueden influir en la germinación de las esporas fúngicas y en el desarrollo de las semillas de las orquídeas, y en el posterior establecimiento de las rizobacterias. Además, en la corteza del hospedero se acumulan los restos orgánicos que permiten el establecimiento de los hongos orquideoides en el tejido cortical de las raíces de las orquídeas epífitas.

ANEXOS



Anexo 1. Curva patrón de fosfato dibásico de potasio ($K_2 HPO_4$)



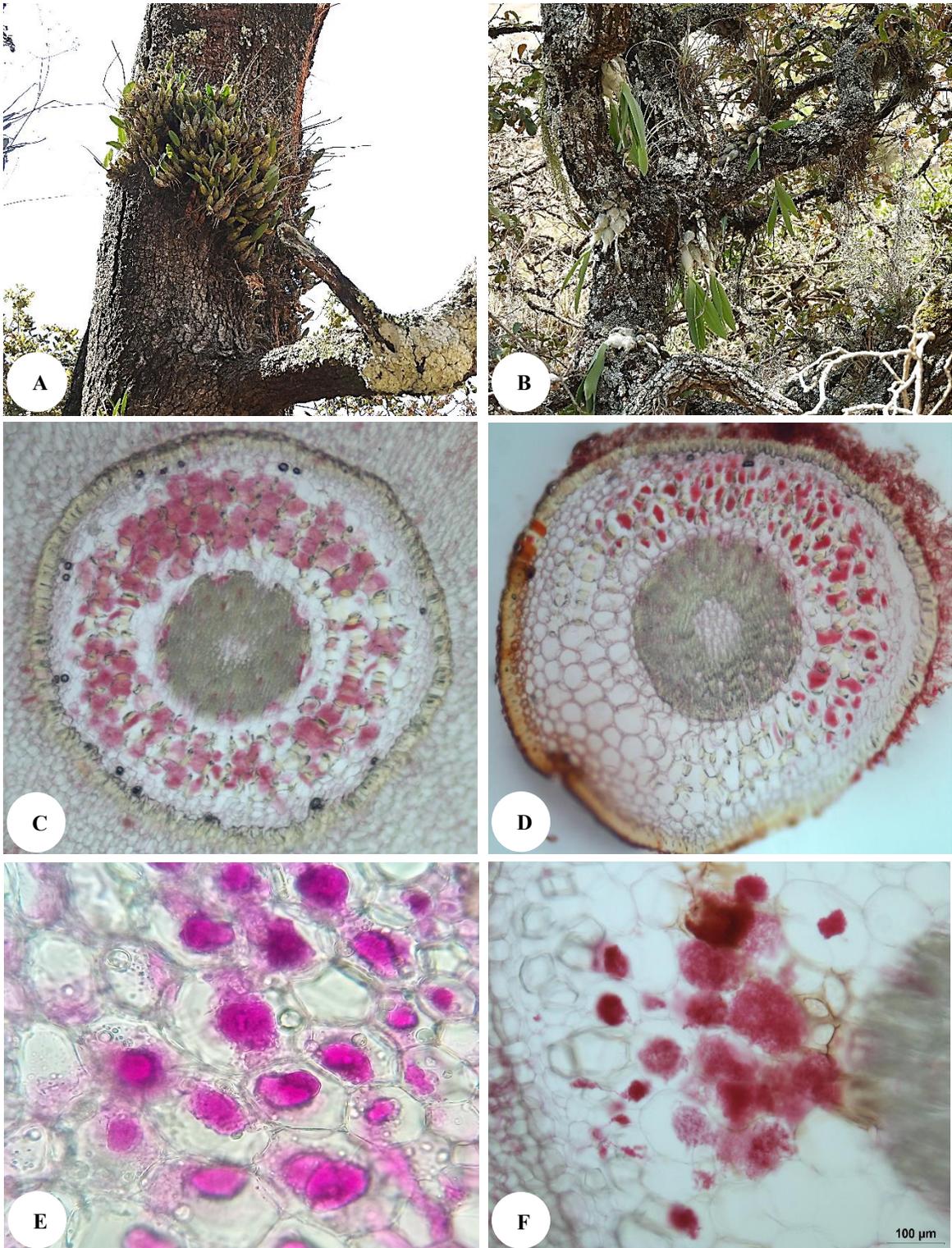
Anexo 2. Curva patrón de ácido indolacético (AIA)

Anexo 3. Características de las colonias de las cepas de bacterias aisladas.

Aislamiento	Color	Forma	Margen	Elevación	Superficie
L.f.1	amarillo	circular	entero	cóncava	lisa brillante
L.f.2	rosa claro	circular	entero	cóncava	lisa brillante
L.f.3	traslucida	circular	entero	cóncava	lisa brillante
L.f.4*	traslucida	circular mediana	entero	cóncava	lisa
L.f.5	melón	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.6	traslucida	circular grande	entero	cóncava	lisa
L.f.7*	traslucida	circular pequeña	entero	cóncava	lisa
L.f.8*	traslucida	circular	entero	poca elevación	lisa
L.f.9	traslucida	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.10*	traslucida	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.11	crema	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.12*	traslucida	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.13	amarilla	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.14	rosa	ovalada	entero	cóncava	lisa
L.f.15*	amarillo intenso	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.16	traslucida	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.17*	traslucida	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.18	beige	circular	entero	poca elevación	lisa
L.f.19	rosa claro	circular	entero	cóncava	lisa
L.f.20*	traslucida	circular muy pequeña	entero	sin elevación	lisa
P.w.1	amarillo claro	circular	entero	cóncava	lisa
P.w.2	rosa	circular	entero	cóncava	lisa
P.w.3	beige	ovalada	entero	cóncava	lisa
P.w.4	crema	circular pequeña	entero	sin elevación	lisa
P.w.5*	amarillo	circular	entero	cóncava	lisa
P.w.6*	beige	circular	entero	poca elevación	lisa
P.w.7	amarillo	circular	entero	poca elevación	lisa
P.w.8	crema	un poco ovalada	entero	cóncava	lisa
P.w.9	beige	circular	entero	cóncava	lisa
P.w.10	traslucida	circular grande	entero	cóncava	lisa
P.w.11	crema oscuro	circular	entero	cóncava	lisa
P.w.12	traslucida	muy pequeña	entero	sin elevación	lisa
P.w.13	roja	circular pequeña	entero	cóncava	lisa
P.w.14	amarilla	circular	entero	sin elevación	lisa sin brillo
P.w.15	rosa	circular	entero	cóncava	lisa
P.w.16	beige	ovalada	entero	cóncava	lisa
P.w.17	beige	circular muy pequeña	entero	cóncava	lisa
P.w.18	blanquecina	circular muy pequeña	entero	sin elevación	lisa viscosa
P.k.1	amarilla	circular	entero	poca elevación	lisa
P.k.2	traslucida	circular	entero	cóncava	lisa
P.k.3	crema	circular pequeña	entero	sin elevación	lisa
P.k.4	transparente	circular grande	entero	sin elevación	lisa
P.k.5	crema	circular	entero	sin elevación	lisa
P.k.6	traslucida	circular	entero	Sin elevación	lisa

P.k.7	blanquecina	circular muy pequeña	entero	sin elevación	lisa
P.k.8	crema	circular muy pequeña	entero	cóncava	lisa
P.k.9	beige	ovalada	entero	cóncava	lisa
P.k.10	blanquecina- beige	circular muy pequeña	entero	sin elevación	lisa
P.k.11	crema	circular	entero	Sin elevación	lisa
P.k.12	beige	circular	entero	cóncava	lisa
P.k.13	melón intenso	circular muy pequeña	entero	Sin elevación	lisa
P.k.14	traslucida	circular pequeña	entero	cóncava pronunciada	lisa
P.k.15	beige	circular pequeña	entero	sin elevación	un poco rugosa
P.k.16	crema	circular	entero	cóncava	lisa
P.k.17	beige-amarilla	circular	entero	cóncava	lisa
P.k.18	traslucida	circular muy pequeña	entero	sin elevación	lisa
P.k.19	traslucida	circular	entero	cóncava	lisa
P.k.20	traslucida- blanquecina	circular	entero	cóncava	lisa
P.k.21	naranja	circular	entero	sin elevación	lisa opaca
P.k.22	roja	circular muy pequeña	entero	sin elevación	lisa brillante
P.k.23	blanquecina	circular muy pequeña	entero	sin elevación	lisa opaca
P.k.24	amarilla pálida	circular pequeña	entero	sin elevación	lisa
P.k.25	rosa clara	circular pequeño	entero	sin elevación	lisa
P.k.26	beige	circular	entero	sin elevación	lisa
P.k.27	amarilla	circular	entero	cóncava	un poco rugosa
P.k.28	traslucida	circular grande	entero	cóncava	lisa brillante
P.k.29	crema	circular	entero con ornamen- tación	sin elevación	lisa
R.a.1	naranja	circular	entero	cóncava	lisa sin brillo
R.a.2	crema	ovalada	entero	sin elevación	lisa
R.a.3	melón	circular	entero	cóncava	lisa
R.a.4	crema	circular pequeña	entero	poca elevación	lisa
R.a.5	hialina	circular pequeña	entero	poca elevación	lisa
R.a.6	traslucida	circular grande	entero	cóncava	lisa
R.a.7	crema	circular	entero	cóncava	lisa
R.a.8	blanquecina	circular	entero	cóncava	lisa
R.a.9	amarilla	circular pequeña	entero	poca elevación	lisa
R.a.10	crema	circular pequeña	entero	sin elevación	lisa
R.a.11	traslucida	circular grande	entero	cóncava	lisa viscosa

L.f. = *Laelia furfuracea* de la comunidad Santa Catarina Estetla; P.w. = *Prosthechea karwinskii* de Santa Catarina Estetla; P.k. = *Prosthechea karwinskii* de La Purísima Concepción; R.a. = *Rhynchostele aptera* de San Esteban, Atatlahuca; * = Aislamientos bacterianos de los cuales se efectuó extracción de ADN, secuenciación y actualmente se encuentran en proceso de identificación molecular y filogenética.



Anexo 4. Crecimiento de las orquídeas en su habitat natural y colonización micorrícica en el tejido cortical de las raíces de las orquídeas. A) crecimiento de *L. furfuracea*; B) crecimiento de *P. karwinskii*; C) 100 % de colonización en el tejido cortical de *L. furfuracea*; D) 50 % de colonización en el tejido cortical de *P. karwinskii*; E) pelotones digeridos en el cortex de *P. karwinskii*; F) pelotones en diferentes estados de digestión en el cortex *L. furfuracea*.

APÉNDICE

Apéndice A.1. Medio de cultivo fuente combinada de carbono para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (Rennie, 1981).

Reactivo	Cantidad (g L ⁻¹)
Solución A	
KH ₂ PO ₄	0.2
K ₂ HPO ₄	0.8
NaCl	0.1
Na ₂ Fe EDTA	0.014
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.025
Extracto de levadura	0.1
Manitol	5.0
Sacarosa	5.0
Lactato de sodio 60 % (v/v)	0.5 mL
Agar	15
Agua destilada	900 mL
Solución B	
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.06
Agua destilada	100 mL

Cada solución se prepara por separado y se ajusta el pH a 7.0. Se esteriliza a 18 lb durante 18 minutos. La solución B, se deja enfriar y se agrega 5 µg L⁻¹ de biotina y 10 µg L⁻¹ de ácido p-aminobénzoico. Al final se mezclan ambas soluciones.

Stock de Biotina

Biotina	0.001 g
Agua destilada	20 mL
	5 µg = 0.1 mL

Stock de ácido p-aminobénzoico

Ác. p-aminobénzoico	0.001 g
Agua destilada	20 mL
	10 µg = 0.1 mL

Cada uno de los stocks se filtra con una membrana o pirinola de 0.22 µm, se guardan en frascos de vidrio esterilizados, y se mantienen en refrigeración.

Apéndice A.2. Medio de cultivo para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, modificado (Rennie, 1981).

Reactivo	Cantidad (g L ⁻¹)
Solución A	
K ₂ HPO ₄	0.8
KH ₂ PO ₄	0.2
NaCl	0.1
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.025
Na ₂ Fe EDTA	0.014
Agar	20
Agua destilada	900 mL
Solución B	
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.06
Agua destilada	100 mL

Cada solución se prepara por separado y se ajusta el pH a 7.0. Se esteriliza a 18 lb durante 18 minutos. La solución B, se deja enfriar y se agrega 5 µg L⁻¹ de biotina y 10 µg L⁻¹ de ácido p-aminobénzoico. Al final se mezclan ambas soluciones.

Apéndice A.3. Medio para bacterias solubilizadoras de fosfato (Pikovskaya).

Reactivo	Cantidad (g L ⁻¹)
Glucosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.1
KCl	0.2
Extracto de levadura	0.5
MnSO ₄ * H ₂ O	0.0002
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.0002
Agar	15
Agua destilada	1000 mL

Ajustar el pH a 7.0

Enfriar las cajas, para lograr una solidificación rápida del medio y evitar la condensación del fosfato tricalcico.

Apéndice A.4. Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) modificado.

Reactivo	Cantidad (g L ⁻¹)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Triptófano	0.5
Agar	20

Ajustar el pH a 7.5